

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ABIÓTICOS E BIÓTICOS  
DE UMA ÁREA PETROQUÍMICA DA REGIÃO DE PAULÍNIA, SP, E  
FOTODOCUMENTAÇÃO DOS FUNGOS TRANSIENTES ISOLADOS**

**ALINE DA SILVA CRUZ**

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

**Agosto - 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ALINE DA SILVA CRUZ**

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ABIÓTICOS E BIÓTICOS  
DE UMA ÁREA PETROQUÍMICA DA REGIÃO DE PAULÍNIA, SP, E  
FOTODOCUMENTAÇÃO DOS FUNGOS TRANSIENTES ISOLADOS**

**Orientadora: Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca**

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

**Rio Claro**  
Agosto - 2010

589.2 Cruz, Aline da Silva  
C957a Avaliação dos fatores abióticos e bióticos de uma área petroquímica da região de Paulínia, SP, e fotodocumentação dos fungos transientes isolados. Aline da Silva Cruz. - Rio Claro: [s.n.], 2010  
134 f. : il., figs., gráfs., forms., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Derlene Attili de Angelis  
Co-Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Fungos. 2. Fungos filamentosos. 3. Leveduras. 4. Diversidade fúngica. 5. Acervo de culturas. 6. Efluente industrial. I. Título.

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



*Dedico aos meus pais, Noeme e Antonio, o cumprimento de mais essa etapa em minha vida...*

## AGRADECIMENTOS

*Outra vez, agradeço a Deus por mais essa etapa alcançada.*

*E novamente, agradeço aos meus pais, Noeme e Antonio, por continuarem me apoiando para a realização deste passo, por todo incentivo e ajuda que me proporcionaram. Muito obrigada por tudo! Espero de alguma maneira poder retribuir-lhes ao máximo o que me possibilitaram até então... Acho que finalmente chegou a hora!*

*Agradeço também à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Derlene Attili de Angelis, por tudo que vivenciamos nesses 2 anos do meu mestrado, pela confiança depositada em mim, pela orientação, convivência e amizade. Certamente, nossa relação ultrapassou os limites de trabalho e agradeço a você e à sua família pelos bons momentos de descontração e por tudo que me ajudaram e proporcionaram. Muito obrigada!!!*

*Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca pela co-orientação do trabalho e por nos disponibilizar o Laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Dr. Mauricio Bacci e sua equipe pelo auxílio e disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular. À toda equipe do Centro de Estudos de Insetos Sociais pelo apoio técnico-científico e também pelos momentos de descontração.*

*À CAPES, pela concessão do apoio financeiro, à PETROBRÁS, ao CNPq e à FAPESP pelos auxílios financeiros direto e indireto que permitiram a realização deste trabalho.*

*Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dejanira de Franceschi de Angelis pela grande colaboração de importância fundamental para este trabalho, pelos dados cedidos, apoio financeiro, pelos ensinamentos, dicas, incentivo e influência (meu ponto de partida pelo interesse em Microbiologia!).*

*Agradecimentos ao Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião, por toda sua contribuição nas análises estatísticas que foram muito enriquecedoras para o trabalho, pela paciência e disponibilidade.*

*Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia pelo suporte disponibilizado, à equipe de técnicos, especialmente Zito, Luíza e Inês, à Prof<sup>a</sup> Dilza que colaborou no trabalho por diversas vezes, aos colegas da Pós-graduação (e também da graduação!) em Microbiologia Aplicada.*

*À toda equipe do Laboratório de Microbiologia, pelo privilégio dessa maravilhosa convivência, pelos grandes momentos compartilhados, pela grande amizade que cativamos, pelos auxílios, ensinamentos e aprendizados, conversas, desabafos e descontrações... Foi muito bom ter dividido tudo isso com vocês... Sucesso a todos que fazem ou fizeram parte dessa equipe: Tati, Paula, Thais, Fábio, Ana, Virgínia, Liu, Mara, Ife, Lucas, Diogo, Luíza, aos novatos Noemi, Dirce, Weilan e Silvío, que apesar do pouco tempo de convivência foi suficiente para nos identificarmos. Agradecimentos ao mais novo Prof. Dr. André Rodrigues, por todo suporte que me forneceu no início do trabalho e ao longo dele, por tudo que me ensinou nos meus primeiros passos da Micologia. Muito obrigada a todos vocês!!!*

*Aos meus amigos “rio-clarenses” de longa data, uns mais presentes, outros mais marcantes, de todas as formas, muito obrigada por todos os momentos que pudemos compartilhar: Paty, minha “irmã querida”, sempre pronta para me dar apoio e me salvar de infinitas situações; Sarah, grande amiga, compreensiva e cúmplice de inúmeras situações, obrigada pelo apoio nas horas mais difíceis; aos Degusta (e ex-moradores também) que, apesar da interrupção de nosso convívio, jamais poderia esquecer que foram as pessoas que tornaram possível minha inscrição e, conseqüentemente, meu ingresso no mestrado.*

*Às companheiras de casa, inclusive às “moradoras flutuantes” e agregadas: Luciana, Daiana, Aline “Castanha”, Bia, Marina Pinheiro (e família), Marina Castanho e Gabi, muito obrigada pela convivência, pela união que fez da nossa casa um ambiente tão agradável! Em especial à Aline Nondillo (Guria!), grande parceira na maior parte desses 2 anos, com quem aprendi muito e com quem pude contar nas horas mais difíceis pelas quais vivenciamos. E claro, à minha fiel escudeira, Boquinha, minha companheira felina, sempre ao meu lado, especialmente nas longas noites frente ao computador...*

*E a todos que fizeram parte ou contribuíram de algum modo para a concretização deste trabalho.*

*“Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas.” – Carlos Di Celio e Rafael Genu – F/Nazca.*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	9
<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	11
<b>CAPÍTULO 1 – Influência de fatores abióticos em fungos transientes na região de Paulínia, SP.</b> .....	12
<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1. Importância dos fungos para o ecossistema .....	17
2.2. A área estudada .....	20
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. Meios de cultura utilizados para isolamento dos fungos .....	23
4.1.1. Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures®) .....	23
4.1.2. Ágar Sabouraud dextrose (Meio L) .....	23
4.1.3. Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures®) – armazenamento em tubo de cultura .....	23
4.2. Locais de coletas e caracterização dos pontos .....	23
4.3. Isolamento de fungos .....	27
4.4. Análises físicas e químicas .....	27
4.5. Análises estatísticas .....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1. Tendências dos parâmetros .....	29
5.2. Análises estatísticas .....	37
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO 2 - Fotodocumentação dos fungos isolados na região de Paulínia, SP.</b> .....	49
<b>RESUMO</b> .....	50
<b>ABSTRACT</b> .....	51

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	54
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	61
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	62
4.1. Meios de cultura utilizados para identificação dos fungos .....	62
4.1.1. Ágar aveia (OA) .....	62
4.1.2. Ágar Czapek extrato de levedura (CYA) .....	62
4.1.3. Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures®).....	62
4.1.4. Ágar nutriente sintético (SNA).....	62
4.2. Meios de cultura basais para provas bioquímicas (somente para leveduras)....	63
4.2.1. Meio basal para assimilação de fonte de carbono (C).....	63
4.2.2. Meio basal para assimilação de fonte de nitrogênio (N).....	63
4.2.3. Meio basal para teste de crescimento na presença de alcoóis .....	64
4.2.4. Meio basal para teste de resistência a ciclo-heximida.....	64
4.2.5. Teste de crescimento em meio <i>vitamin-free</i> .....	64
4.3. Reagentes e soluções .....	64
4.3.1. Solução salina 0,85% .....	64
4.3.2. Solução de cloranfenicol .....	64
4.3.3. Czapek concentrado .....	65
4.3.4. Solução de glicerol 15% .....	65
4.3.5. Solução de lise.....	65
4.3.6. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque) .....	65
4.3.7. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x.....	66
4.3.8. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x.....	66
4.3.9. Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão) .....	66
4.3.10. Gel de agarose 1% .....	66
4.3.11. Gel de agarose 1,4% .....	66
4.3.12. Marcador de massa molecular .....	66
4.3.13. <i>Primers</i> .....	67
4.3.14. Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer” .....	67
4.3.15. Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969).....	67
4.4. Locais de coleta e isolamento de fungos .....	67
4.5. Identificação e caracterização dos isolados .....	67

4.5.1. Identificação por caracterização morfológica .....	67
4.5.2. Identificação molecular .....	68
4.6. Preservação das culturas .....	71
4.7. Documentação dos fungos .....	72
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>120</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>131</b>
Resultados do teste MANOVA realizado no <i>software</i> SAS 9.1.3 .....	131
Análise de correlações canônicas geradas no SAS 9.1.3. ....	131

## APRESENTAÇÃO

Há aproximadamente meio século iniciaram-se estudos dos efeitos das atividades antrópicas sobre a natureza. Atualmente, relatórios sobre impacto ambiental analisam o problema sob diferentes aspectos, tais como os da legislação, da segurança, da arquitetura e do impacto social, além dos problemas clássicos para a saúde humana. Apesar de alguns esforços, as tentativas de se estabelecer uma convivência harmoniosa entre a natureza e o progresso ainda encontram-se longe da situação ideal. É fato que as atividades humanas provocam grandes modificações na estrutura do ambiente, porém estas mudanças só podem ser evidenciadas e comprovadas mediante a continuidade da investigação científica, a qual permite entender o comportamento de um mesmo parâmetro ao longo do tempo.

No final da década passada (1997), um projeto de pesquisa propôs avaliar a qualidade das águas do Rio Atibaia na região de influência de um pólo petroquímico situado em Paulínia, SP. Desde então, dados físicos, químicos, toxicológicos e microbiológicos têm sido periodicamente obtidos e analisados. Justificou-se a escolha do rio pela sua abrangência, pois durante seu percurso atravessa 16 municípios paulistas e um mineiro, abastecendo o fornecimento de água de uma região industrial e econômica considerada como suporte da maior parcela do Produto Interno Bruto (PIB) do país.

Neste contexto, o presente trabalho contempla dois propósitos de grande relevância: o primeiro enfoca análises quantitativas, mediante a investigação da influência de alguns parâmetros abióticos sobre a contagem das unidades formadoras de colônias de fungos transientes em amostras de água do Rio Atibaia e de regiões próximas, na área de influência do pólo petroquímico de Paulínia, SP. O segundo, sob a ótica qualitativa, preocupou-se com o levantamento e a catalogação da biota fúngica presente nestas amostras. Fungos transientes constituem geofungos, na maioria, que ocorrem de forma transitória em um ambiente aquático. Apesar de não dependerem da água para completar o ciclo de vida, podem desempenhar funções importantes neste ambiente.

Além disso, o isolamento destes fungos fomentará a coleção de culturas e o banco de dados de interesse ambiental e industrial do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro, SP. As análises físicas e químicas servirão de base para se compreender como estes micro-organismos, conhecidos degradadores de substâncias complexas, comportam-se mediante as condições impostas no período estudado. Para tornar a apresentação destas abordagens mais didática, cada uma será



desenvolvida na forma de capítulos independentes, porém sabe-se que ambas complementam-se, contribuindo assim para uma análise ambiental mais abrangente desta região.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Com o propósito de entender o impacto do efluente da refinaria petroquímica de Paulínia sobre as águas do Rio Atibaia, onde é descartado, o trabalho teve os seguintes objetivos:

2.1. Analisar a influência de alguns parâmetros abióticos sobre o número de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos e leveduras transientes, isolados das águas dos rios Atibaia e Jaguari, bem como dos efluentes bruto e tratado da refinaria de petróleo de Paulínia, SP;

2.2. Fotodocumentar e preservar as espécies fúngicas encontradas nas amostras mencionadas no item anterior.

## **CAPÍTULO 1**

# **INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS EM FUNGOS TRANSIENTES NA REGIÃO DE PAULÍNIA, SP.**

## RESUMO

A ocupação do solo e a demanda de água doce tem sido crescente, de maneira que pesquisas voltadas à avaliação da qualidade das águas em áreas estratégicas são consideradas fundamentais. Neste contexto, a área de estudos foi escolhida pela disponibilidade de água, distribuição demográfica e pela sua importância industrial. Com o propósito de melhor compreender o impacto causado pelo efluente do pólo petroquímico de Paulínia, SP, na qualidade das águas do rio Atibaia, os parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), temperatura da água, sólidos totais, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total (NT), íons fósforo (íons P), pluviosidade, estações seca e chuvosa, condutividade elétrica da água e concentração de cloretos foram analisados. Verificou-se, ainda, a influência dos parâmetros mencionados sobre a microbiota transiente de amostras coletadas no período entre agosto de 2007 a março de 2009. O método de plaqueamento para contagem dos fungos e as análises físicas e químicas seguiram Clesceri et al. (1998). Correlação de Pearson, análise de variância multivariada, correlação canônica para dados multivariados e análise dos componentes principais foram as análises estatísticas realizadas. Estas revelaram diferentes influências dos parâmetros independentes sobre as contagens fúngicas. A microbiota transiente detectada no período estudado foi sensível aos parâmetros cloretos, sólidos totais, condutividade elétrica da água e OD, pois estes fatores abióticos influenciaram negativamente nas contagens. Entretanto, o número de colônias de fungos foi estimulada positivamente pela pluviosidade (estação chuvosa), DBO, turbidez e NT. Das análises estatísticas, apenas a correlação de Pearson pareceu não ser eficiente para estudos ambientais sujeitos a variações diversas.

## ABSTRACT

The use of the soil and fresh-water has increased, so that investigations on the water quality in strategic areas are considered of fundamental importance. In this context, the study area was chosen for its water availability, demographic distribution and industrial relevance. With an eye on the water quality of the influence of an industrial effluent discharged in the Atibaia river, in the surroundings of a petrochemical refinery in Paulínia, SP, the following parameters were analyzed: pH, water temperature; total dissolved solids; turbidity; dissolved oxygen (DO); biochemical oxygen demand (BOD), total nitrogen (TN), phosphorous; rain; dry and rain seasons; water conductivity and chlorides. Also, the influence of these parameters on transient mycota between August 2007 and March 2009 was investigated. The method for counting the forming colony units of fungi was according to Clesceri et al. (1998). Pearson correlation coefficient, multivariate analysis of variance, canonical correlation to multivariate data and principal component analysis were the statistical methods employed. The results revealed differences in the influence of the independent parameters on the counting of fungal colony forming units (CFU). The fungi present in the samples were negatively affected by chloride concentration, total dissolved solids, water conductivity and DO. However, the CFU was increased by the rain, BOD, turbidity and TN. Among the statistical tests used, only Pearson correlation was not satisfactory for our studies.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, o homem procurou assegurar sua subsistência ao redor dos recursos de água doce. Embora o Estado de São Paulo disponha de razoável condição hidrológica na maior parte de seu território, 81,7% da sua população concentra-se na região leste (ANGELIS et al., 2009), resultando em uma elevada ocupação do solo e preocupante demanda da quantidade e qualidade da água. A população da região está estimada em 41.952.860 habitantes para o ano de 2010 (SEADE, 2010), aumentando a necessidade de água para abastecimento urbano e industrial, irrigação, geração de energia elétrica, recreação, navegação e recebimento de efluentes urbanos e industriais.

Dentre as pesquisas voltadas ao meio ambiente no Estado de São Paulo, encontra-se a avaliação da qualidade das águas em áreas estratégicas. Na região da cidade de Campinas e em particular no município de Paulínia, por exemplo, encontram-se importantes indústrias químicas e de papel, que descartam seus efluentes no Rio Atibaia, o qual também recebe resíduos clandestinos e outros originados dos esgotos urbanos não tratados (PIÃO et al., 2009). O rio Atibaia nasce no município de mesmo nome, é formado pelos rios Atibainha e Cachoeira e percorre 16 municípios até atingir as cidades de Campinas e Paulínia. Além desta área concentrar a maior parcela da população, o rio ainda sofre a interferência do pólo petroquímico (KORDA et al., 1997). O conjunto de esgotos urbanos (tratados ou não) e industriais promove interferências que afetam inevitavelmente a vida microbiana do Rio Atibaia, classificado como classe II (CONAMA, 2005).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB – utiliza o denominado Índice de Qualidade da Água (IQA) para estabelecer critérios de aceitabilidade da água para consumo. Tais parâmetros foram indicados por especialistas em qualidade de água, que os consideraram relevantes para compor um valor numérico que indica a utilização para abastecimento público. Os parâmetros escolhidos para cálculo do IQA foram: turbidez, resíduo total, temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), fósforo total, nitrogênio total (NT) e coliformes fecais (*Escherichia coli*) (CETESB, 2009b).

Enquanto as atividades antrópicas provocam modificações estruturais no ambiente e produzem resíduos, alguns muito complexos e xenobióticos, os micro-organismos possuem papel importante na degradação de tais compostos (UETA et al., 1999). De acordo com as condições ambientais às quais estejam submetidos, os fungos podem adequar suas atividades

metabólicas utilizando as substâncias dispersas no ambiente para garantir sua sobrevivência (ALEXOPOULOS et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2003).

Muitos fungos são altamente tolerantes a concentrações extremas de íons hidrogênio e podem ser encontrados tanto em ambientes ácidos quanto alcalinos (SINGH, 2006). Além disso, os fungos são capazes de excretar variadas enzimas decompositoras de macromoléculas para posterior absorção do alimento pré-digerido para o interior de suas células (BENNETT, 1998). Assim, os fungos tornam-se responsáveis pela biodegradação das mais diversas substâncias, bem como são capazes de promover a biossorção de metais pesados e corantes (CONCEIÇÃO et al., 2004). Devido a estas características, muitos estudos têm buscado espécies fúngicas para processos de biorremediação no intuito de amenizar problemas de poluição ambiental (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007; SINGH, 2006).

Assim, dada a importância da Bacia Hidrográfica do Rio Atibaia, consideramos estratégico analisar a qualidade de suas águas, procurando determinar se alguns dos parâmetros abióticos indicados pela CETESB podem interferir sobre a população de fungos transientes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Importância dos fungos para o ecossistema

A maioria dos fungos, bem como outros micro-organismos é benéfica ao homem e aos outros seres vivos (Tabela 1). São sapróbios, decompõem resíduos complexos de plantas e animais transformando-os em substâncias reaproveitáveis pelas gerações vegetais subsequentes. Desse modo, a atividade fúngica é amplamente responsável pela fertilidade do solo e a ciclagem de nutrientes (CGEE, 2009; HAWKSWORTH et al., 1995; MACHADO, 2006; WAINWRIGHT, 1990).

**Tabela 1.** Benefícios e prejuízos ocasionados pelos fungos sob uma visão antropocêntrica (adaptado de MACHADO, 2006)

Benefícios	Prejuízos
Atividade decompositora – ciclagem de nutrientes.	Responsável por alergias, problemas respiratórios e micoses em animais (superficiais e profundas).
Fito-associações (ex.: micorrizas, líquens).	Fitopatologias – grandes perdas na agricultura, florestas e reflorestamentos.
Controle biológico	Produção de micotoxinas em grãos e alimentos manufaturados.
Produção de metabólitos para indústria farmacêutica (antibióticos, hormônios, ácidos orgânicos).	Biodeterioração de alimentos, tecidos, madeiras, artigos comerciais, revestimentos, pinturas, obras de arte e outros.
Produção de biomassa (cogumelos).	
Atividade enzimática (enzimas utilizadas na indústria em geral).	
Biotransformações (fermentações, compostagem, produção de esteróides).	
Outras aplicações biotecnológicas (biopolpação, biorremediação).	

Em média, 75 a 80% das plantas vasculares possuem associação mutualística com fungos endofíticos; muitos deles auxiliam no processo de fixação de nitrogênio (HAWKSWORTH, 1991). Algumas pesquisas revelaram que diversas substâncias bioativas encontradas nas plantas são provavelmente produzidas pelos micro-organismos associados a elas (PINTO et al., 2002).



Entretanto, alguns metabólitos produzidos pelos fungos podem ser tóxicos e/ou carcinogênicos aos mamíferos, como as micotoxinas. Nas regiões tropicais, onde o clima e a disponibilidade de nutrientes favorecem a proliferação dos fungos, a produção de micotoxinas ocorre, contaminando alimentos estocados, em especial cereais, desencadeando vários problemas de saúde pública (PINTO et al., 2002).

A produção de toxinas pelos fungos também permite que desempenhem papel importante no controle biológico de outros organismos (HAWKSWORTH, 1991). Muitas das substâncias fúngicas são consideradas agroquímicos naturais, como no caso das destruxinas (inseticidas), estrobilurinas (fungicidas) e fitotoxinas (herbicidas). Essa aplicação atribuída aos fungos tem aumentado expressivamente e isso remete à necessidade de haver mais incentivo às pesquisas sobre a química fúngica (PINTO et al., 2002).

Fungos são capazes de excretar enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação das mais diversas substâncias (BENNETT, 1998; CONCEIÇÃO et al., 2004). Estes microorganismos degradam eficientemente celulose e lignina, apresentando um papel importante na decomposição de folhas, sendo mais ativos e bem-sucedidos do que as bactérias, principalmente nos estágios iniciais de decomposição (KAUSHIK; HYNES; TRISKA apud BÄRLOCHER; KENDRICK, 1974). Em 1974, Bärlocher e Kendrick demonstraram que a presença de micélio de vários fungos isolados de folhas em um córrego apresentou alto valor nutricional para o detritívoro *Gammarus pseudolimnaeus* Bousfield, além de influenciar na palatabilidade das mesmas para os invertebrados. A decomposição inicial das folhas pelos fungos é fundamental para que outros organismos possam digerir e assimilar os nutrientes nela presentes.

Em virtude destas características, alguns estudos têm buscado espécies que possam ser úteis em processos de biorremediação, no intuito de amenizar problemas de poluição ambiental (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007; PRENAFETA-BOLDÚ, 2002). Ao estudo de fungos para aplicação nesta área dá-se o nome de micorremediação (SINGH, 2006). Basicamente, a técnica consiste na utilização de fungos filamentosos e leveduras que possuam habilidades para modificar ou decompor poluentes, diminuindo suas concentrações e/ou toxicidade, ou buscando ainda a mineralização total, que resultará em gás carbônico (CO<sub>2</sub>), água e biomassa (KORDA et al., 1997; MACEDO et al., 2009). Entende-se que um consórcio de espécies microbianas produz resultados mais eficientes, pois cada qual utiliza diferentes compostos e em diferentes concentrações (ALEXANDER apud HOPKINS, 1996; CONCEIÇÃO et al., 2004, KORDA et al., 1997; SINGH, 2006).

Infelizmente, devido às atividades antrópicas, muitos ambientes se alteram de forma drástica e muitas espécies podem ser perdidas nos microcosmos mais sensíveis. As alterações causadas pelo ser humano produzem resíduos que podem apresentar-se inertes ou não. Uma atividade que induz a modificações no ambiente relaciona-se com a exploração, refino e uso do petróleo e seus derivados. Como exemplo, pode-se mencionar a liberação dos hidrocarbonetos alifáticos aromáticos, solventes industriais (fenóis, benzenos, acetonas), líquidos de baterias, pesticidas e agroquímicos, e metais (arsênico, cromo, selênio) (KORDA et al., 1997). Micro-organismos, especialmente os fungos, possuem papel fundamental na eliminação desses resíduos, pois, caso contrário, tais compostos poderiam resistir por longos períodos no ambiente ou acumular-se em níveis tóxicos nos organismos, após sofrerem modificações estruturais (UETA et al., 1999).

Várias espécies fúngicas podem adequar suas atividades metabólicas para garantir sua sobrevivência (AINSWORTH, 1973; ALEXOPOULOS et al., 1996; DOMSCH et al., 1993; VASCONCELOS et al., 2003). Existem aquelas tolerantes a concentrações extremas de pH, que podem ser encontradas tanto em ambientes ácidos quanto alcalinos (SINGH, 2006). Assim sendo, podem sobreviver em locais considerados inóspitos para outros seres, onde exploram novos nichos e aproveitam, inclusive, moléculas tóxicas como fonte de nutrientes (BOUWER; ZEHNDER apud VASCONCELOS et al. 2003). A versatilidade deste grupo de micro-organismos destaca sua importância e a necessidade de constantes estudos.

Sabe-se que alguns basidiomicetos, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus* possuem grande habilidade de degradar lignina, assim como compostos xenobióticos (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007). Alguns representantes do gênero *Penicillium* são capazes de crescer em fenol como única fonte de carbono e energia; seus conídios conseguem germinar em concentrações superiores a 1.500 mg de fenol/L (HOFRICHTER et al., 1993). A literatura reporta que estirpes viáveis em áreas próximas ao descarte de efluentes geralmente são capazes de utilizar os poluentes presentes para sua nutrição, caracterizando um conjunto potencialmente útil para despoluição (KORDA et al., 1997; MACEDO et al., 2009).

Em estudos realizados nas águas do Rio Atibaia e no efluente da refinaria de petróleo descartado nesse rio, foram isolados e selecionados fungos filamentosos degradadores de compostos fenólicos e com potencial para utilização em biorremediação de locais contaminados (CONCEIÇÃO et al., 2004). Isto demonstra que o local tem potencial para o isolamento de espécies adequadas a este propósito.

De acordo com D'Annibale et al. (2006), o isolamento de fungos de solos contaminados e sua posterior re-inoculação no ambiente pode constituir-se em uma valiosa estratégia de remediação. Porém, a maioria das pesquisas sobre micorremediação é feita *in vitro* com a utilização de solos artificialmente contaminados com poluentes orgânicos, sob condições estéreis, sendo poucos os dados de estudos de campo em áreas potencialmente contaminadas. Acredita-se que a compreensão sobre como os parâmetros abióticos afetam a população fúngica e como a mesma se comporta possa constituir em importante ferramenta para estudos desta natureza, bem como melhor compreender a biodiversidade de um local.

## 2.2. A área estudada

Dentre as pesquisas voltadas ao interesse da população do Estado de São Paulo, encontra-se a avaliação da qualidade das águas na região do Rio Atibaia. Assim, a área de estudos foi escolhida pela disponibilidade de água, distribuição demográfica e pela sua importância industrial. Com forte interferência dos efluentes do pólo petroquímico situado em Paulínia, SP, este ecossistema tem sido avaliado desde 1997 quanto à toxicidade de suas águas, mediante análises químicas, físicas, microbiológicas e toxicológicas.

O Rio Atibaia e o Rio Jaguari formam o Rio Piracicaba (Fig. 1) reunindo-se no município de Americana, SP (SILVA; JARDIM, 2006). Durante seu percurso abastece numerosos municípios com suas águas, além de receber esgoto doméstico e industrial dos mesmos (PIÃO et al., 2009).



**Figura 1** – Encontro do Rio Jaguari (à esquerda) e Rio Atibaia (à direita), formando o Rio Piracicaba (abaixo). Fonte: <[http://www.fotolog.com.br/americana\\_sp/35981414](http://www.fotolog.com.br/americana_sp/35981414)>.

Dentre os efluentes lançados, o da refinaria é constituído de uma mistura complexa orgânica e inorgânica, proveniente do processo de lavagem e refino do petróleo que, mesmo após tratamento físico, químico e microbiológico ainda contém resíduos do processo industrial (KORDA et al., 1997). Embora o efluente da refinaria esteja enquadrado na

Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente nº 357 de 2005 (CONAMA nº 357/2005), nos parâmetros contemplados nas exigências da legislação, sabe-se que qualquer alteração antropogênica advinda de área industrial e doméstica pode promover alterações que afetam inevitavelmente a micro e a macrobiota sensíveis locais. Atualmente, os Rios Atibaia e Jaguari são de classe II; contudo, muitos esforços se fazem necessários para que esta classificação seja atendida.

Com o objetivo de estabelecer limites para descartes de resíduos e aceitáveis para consumo, a CETESB utiliza o Índice de Qualidade da Água (IQA), que baseia-se em 9 das 35 variáveis de qualidade de água analisadas em rios e reservatórios (CETESB, 2009a). Para a elaboração de tal índice, considera-se o destino da utilização das águas, traduzindo-se suas características em um único número, numa escala de cinco categorias que representam a variável de qualidade de ótima a péssima (PIÃO et al., 2009; SILVA; JARDIM, 2006).

Além dos parâmetros de IQA da CETESB, outros como dureza total, condutividade elétrica e quantidade de cloretos demonstraram grande influência sobre os seres vivos do ecossistema aquático e também podem ser utilizados para complementar as análises sobre a influência tóxica destas variáveis nas comunidades aquáticas.

De acordo com essas informações, iniciar um estudo sobre as alterações sofridas por esse sistema hídrico se fez necessário, dada a importância dessa bacia e também como forma de monitorar o histórico dessas mudanças.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar a influência dos parâmetros pH, temperatura da água, sólidos totais, turbidez, OD, DBO, NT, íons P, pluviosidade, estações seca e chuvosa, condutividade elétrica da água e concentração de cloretos sobre o número de unidades formadoras de colônias de fungos transientes em amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari e no efluente da refinaria de petróleo de Paulínia, SP.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Meios de cultura utilizados para isolamento dos fungos

#### 4.1.1. Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures<sup>®</sup>)

Ágar batata dextrose	39,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### 4.1.2. Ágar Sabouraud dextrose (Meio L)

Peptona de caseína	5,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar	15,0 g
Cloranfenicol	0,05 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

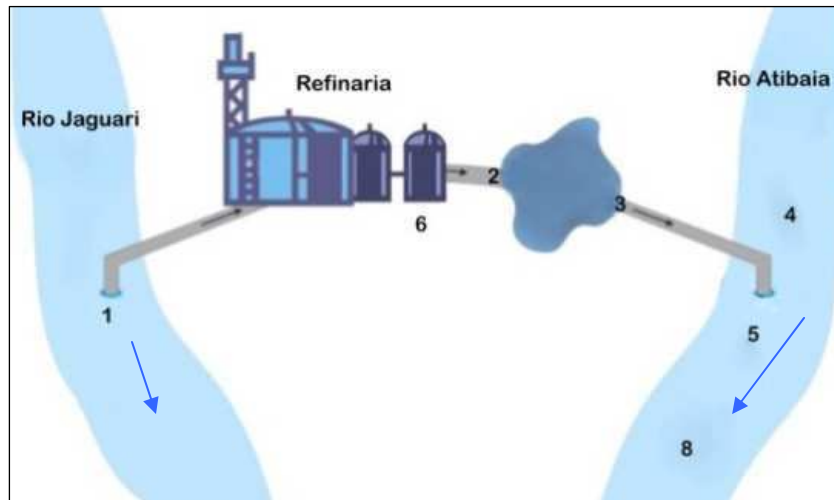
#### 4.1.3. Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures<sup>®</sup>) – armazenamento em tubo de cultura

Extrato de Malte	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

### 4.2. Locais de coletas e caracterização dos pontos

Os locais de coletas encontram-se no município de Paulínia, SP: ao longo do Rio Atibaia (3 pontos), dentro da área da refinaria (3 pontos) e um ponto no Rio Jaguari, tomado como referência, já que não recebe interferência do efluente (Fig. 2). As coletas ocorreram entre agosto de 2007 e março de 2009, totalizando 36 coletas em 7 pontos, num total de 252 amostras. Após a coleta, as amostras foram transportadas protegidas da luminosidade, sob refrigeração e armazenadas a  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  até o momento de serem processadas. Na figura 2 encontra-se a localização dos pontos e os dados obtidos por GPS nos locais de coleta:



Ponto	Local	Latitude (WO)	Longitude (S)
1	Rio Jaguari	22° 42' 00,0"	47° 08' 06,6"
2	Entrada do efluente na Lagoa de Estabilização	22° 44' 26,6"	47° 07' 17,5"
3	Saída do efluente na Lagoa de Estabilização	22° 44' 22,0"	47° 07' 43,0"
4	200 m a montante da descarga do efluente da unidade industrial no Rio Atibaia	22° 44' 43,0"	47° 07' 25,3"
5	Jusante da descarga do efluente tratado da unidade industrial – 200 m no Rio Atibaia	22° 44' 25,3"	47° 07' 35,2"
6	Entrada do efluente bruto da refinaria na estação tratamento biológico	22° 44' 18,8"	47° 07' 19,2"
8	Jusante da descarga do efluente tratado a 800 m no Rio Atibaia	22° 44' 22,3"	47° 07' 40,8"

**Figura 2.** Diagrama dos pontos de coleta e sua localização obtida com auxílio do equipamento GPS – Garmin eTrex Summit®.

O ponto 1 está localizado no Rio Jaguari (Fig. 3). Neste ponto é feita a captação de água utilizada pela indústria, tanto para uso nos seus processos, quanto para o consumo humano dos seus funcionários. A coleta das amostras foi realizada mergulhando-se recipientes até completarem seus volumes. Os pontos 2 e 3 corresponderam, nesta ordem, à entrada na lagoa de estabilização do efluente industrial tratado biologicamente (Fig. 4) e à saída desse efluente estabilizado por aproximadamente 7 dias para o Rio Atibaia (Fig. 5). As amostras dos pontos internos à indústria, ou seja, dos pontos 2, 3 e 6, foram tomadas pontualmente completando-se os volumes dos frascos.



**Figura 3.** Ponto 1 – Rio Jaguari.



**Figura 4.** Ponto 2 - entrada do efluente industrial tratado biologicamente na lagoa de estabilização.



**Figura 5.** Ponto 3 – Saída do efluente tratado e estabilizado para o Rio Atibaia.

Os pontos 4, 5 e 8 estão localizados no Rio Atibaia e correspondem, respectivamente, a 200 m a montante do descarte do efluente tratado e estabilizado em lagoa da indústria (Fig. 6), a 200 m a jusante do descarte desse efluente (Fig. 7) e a 800 m a jusante do descarte (Fig. 8). Nesses pontos, as coletas foram efetuadas na superfície mediante amostragem composta de uma margem à outra, com intervalo aproximado de 10 metros e reunidas nos frascos. O Rio Atibaia é considerado classe II pela Resolução CONAMA 357/2005, e embora o Rio Jaguari esteja na mesma classificação, suas águas parecem sofrer menor interferência antrópica (ANGELIS, 2009).





**Figura 6.** Ponto 4 – 200 m a montante do descarte do efluente no Rio Atibaia.



**Figura 7.** Ponto 5 – 200 m a jusante do descarte do efluente no Rio Atibaia.



**Figura 8.** Ponto 8 – 800 m a jusante do descarte.



**Figura 9.** Ponto 6 – entrada do efluente bruto (industrial e doméstico) na estação de tratamento biológico.

O ponto 6 (Fig. 9) localiza-se no interior da indústria e corresponde à entrada dos efluentes industrial e doméstico brutos na estação de tratamento biológico. O efluente bruto industrial resulta, em grande parte, da lavagem do petróleo, contendo, portanto, resíduos desse composto. O tratamento biológico consiste na entrada desse efluente em tanques de aeração para possibilitar a ação de micro-organismos aeróbios na decomposição de parte das moléculas desse efluente, evitando descartar resíduos diretamente no ambiente. O ponto 7, hoje ausente das amostragens, foi desativado em novembro de 2007 e referia-se ao efluente doméstico, passando a ser analisado em conjunto com o efluente industrial (ANGELIS et al., 2008).

Após a coleta, as amostras foram transportadas protegidas da luminosidade, sob refrigeração e armazenadas a  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  até o momento de serem processadas (Fig. 10).



**Figura 10:** Amostras da coleta realizada em 26 de novembro de 2008.

#### 4.3. Isolamento de fungos

O método de isolamento utilizado foi o recomendado pelo *Standard Methods* (CLESCERI et al., 1998), o qual emprega a técnica de diluição seguido de inoculação pela técnica de *pour plate* em meio BDA, destinado ao crescimento de fungos filamentosos, e meio L (Sabouraud), mais favorável ao crescimento de leveduras. As amostras provenientes dos pontos 1, 2, 3 e 6 foram inoculadas diretamente, sem haver diluição. Já as amostras dos pontos 4, 5 e 8, todas pertencentes ao Rio Atibaia, foram diluídas para a concentração de  $10^{-1}$ . Após 7 dias de incubação a  $25^{\circ}\text{C}$ , foram realizadas as contagens dos números de unidades formadoras de colônias (UFCs). Depois disso, as colônias foram purificadas, mediante estriamento em placa, no caso das leveduras, e inoculação no centro da placa, no caso dos fungos filamentosos. As culturas puras foram armazenadas em tubos de cultura contendo MA 2% inclinado e mantidas a  $10^{\circ}\text{C}$ . Os resultados foram tabelados para posterior análise estatística.

#### 4.4. Análises físicas e químicas

Os valores de pH foram analisados com potenciômetro; a condutividade com uso de condutivímetro; turbidez, cloretos, nitrogênio total e fósforo total por colorimetria; temperatura da água com o auxílio de um termômetro *in situ*; oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e amônia por eletrometria, e sólidos totais por método gravimétrico (CLESCERI et al., 1998).

#### 4.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir da contagem de fungos filamentosos e de leveduras, denominados fatores bióticos, foram analisados juntamente com os resultados de doze parâmetros físicos e químicos, ou fatores abióticos, escolhidos para este estudo. Destes, oito são recomendados pela CETESB, pois fazem parte do Índice de Qualidade das Águas: pH; temperatura; sólidos totais; turbidez; OD; DBO; NT e íons P. Outros quatro, considerados ecologicamente importantes foram: condutividade elétrica da água; cloretos; estação seca e chuvosa e dados sobre a pluviosidade da região, gentilmente cedidos pelo Centro de Análise e Planejamento Ambiental – CEAPLA, do Instituto de Geociências e Ciências Exatas (IGCE) da UNESP de Rio Claro, SP. Inicialmente, realizaram-se representações gráficas das tendências de cada parâmetro individualmente, relacionando os dados obtidos com as datas de cada coleta no período compreendido. Posteriormente, cada parâmetro biótico foi correlacionado com os abióticos, mediante correlação de Pearson (SOKAL; ROHLF, 1995). Objetivou-se verificar a existência ou não de uma correlação entre o número das UFCs dos fungos e esses parâmetros. Então, a partir destes resultados aplicou-se a análise de variância multivariada (MANOVA), para confirmar possíveis diferenças significativas entre os pontos de coleta.

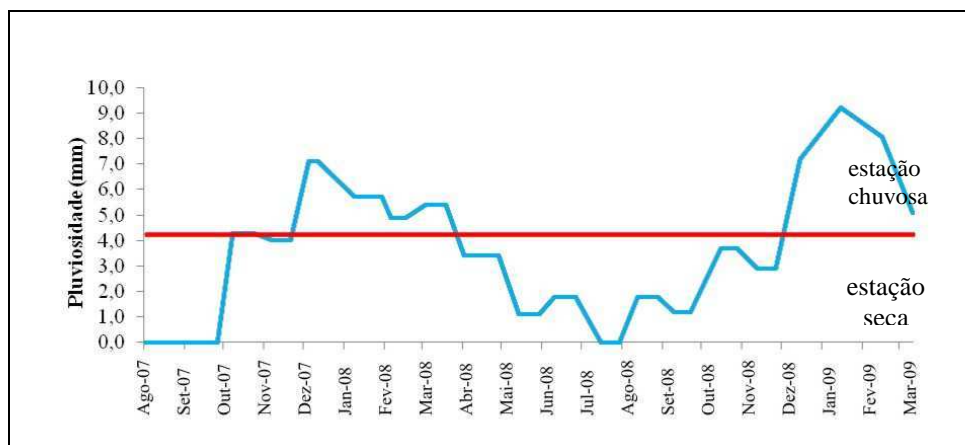
Baseando-se nos resultados de significância da análise de MANOVA procedeu-se à correlação canônica para dados multivariados para certificação da influência dos parâmetros físicos e químicos sobre os fungos (MANLY, 2008). As análises foram realizadas mediante a aplicação dos dados no programa SAS versão 9.1.3. Aplicou-se também a análise de componentes principais (PCA) para determinar a porcentagem de influência que cada fator abiótico estaria exercendo sobre os bióticos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

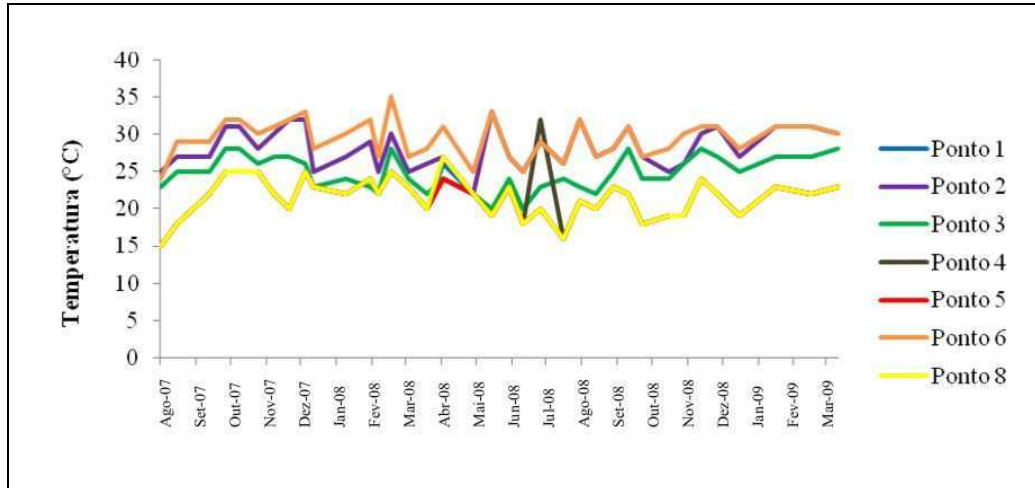
### 5.1. Tendências dos parâmetros

Os dados obtidos com as análises dos parâmetros bióticos e abióticos estudados geraram os gráficos que revelam suas tendências ao longo do período das coletas.

A Figura 11 mostra os períodos de maior intensidade de chuvas e aporte de água nos rios Atibaia e Jaguari. O local foi marcado por duas estações definidas, seca e chuvosa. As chuvas ocorreram de outubro de 2007 a maio de 2008 e de janeiro a março de 2009, quando observou-se o maior índice pluviométrico. Agosto e setembro de 2007 e junho a dezembro de 2008 foram períodos de seca. As médias de temperatura da água do Atibaia (Fig. 12) mantiveram-se praticamente constantes. Entretanto, os pontos 2 e 6 (entrada da lagoa de estabilização e do efluente bruto na estação do tratamento biológico, respectivamente) apresentaram as médias mais altas, enquanto as mais baixas foram observadas nos pontos 5 e 8, ambos a jusante do descarte. Assim, notou-se que o efluente apresentou uma sensível elevação de temperatura, provavelmente em função do processo ao qual é submetido dentro da refinaria. As variações dos meses considerados mais frios ou quentes não foram suficientes para promover uma alteração significativa nas médias da temperatura das amostras dos rios. As médias favoreceram a ocorrência de espécies mesofílicas.

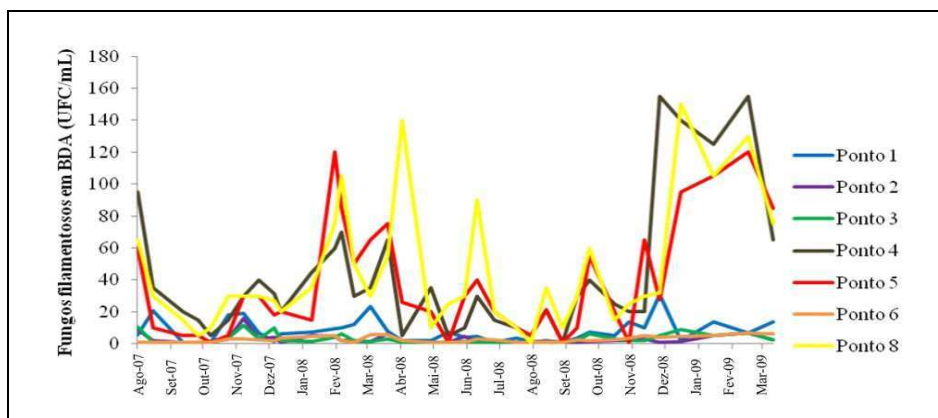


**Figura 11.** Tendência das médias de pluviosidade (mm) e representação gráfica dos períodos de chuva e seca na região de Paulínia, SP, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.



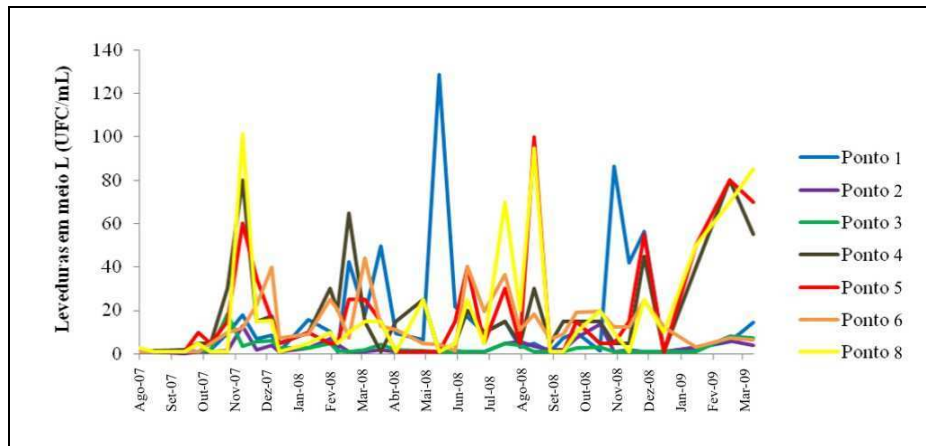
**Figura 12.** Tendência das médias de temperatura da água (°C), das amostras do rio Atibaia na região de Paulínia, SP, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

Os dados médios das contagens de UFCs de fungos filamentosos encontram-se na Figura 13. Os resultados indicaram maiores flutuações nos pontos 5 e 8. O ponto 4 seguiu as mesmas tendências. Verificou-se maiores contagens no período de novembro de 2008 a março de 2009, quando as chuvas foram mais intensas. As UFCs de leveduras (Figura 14), apresentaram maiores oscilações nas águas do rio Jaguari (ponto1), seguidas dos pontos 5 e 8. Notou-se que os pontos localizados no rio Atibaia (4, 5 e 8) responderam rapidamente à influência do período de chuvas, como demonstrado nas Figuras 13 e 14, ao contrário daqueles localizados no interior na refinaria (3, 2 e 6). Estes resultados demonstram uma maior influência da pluviosidade sobre as amostras dos rios.



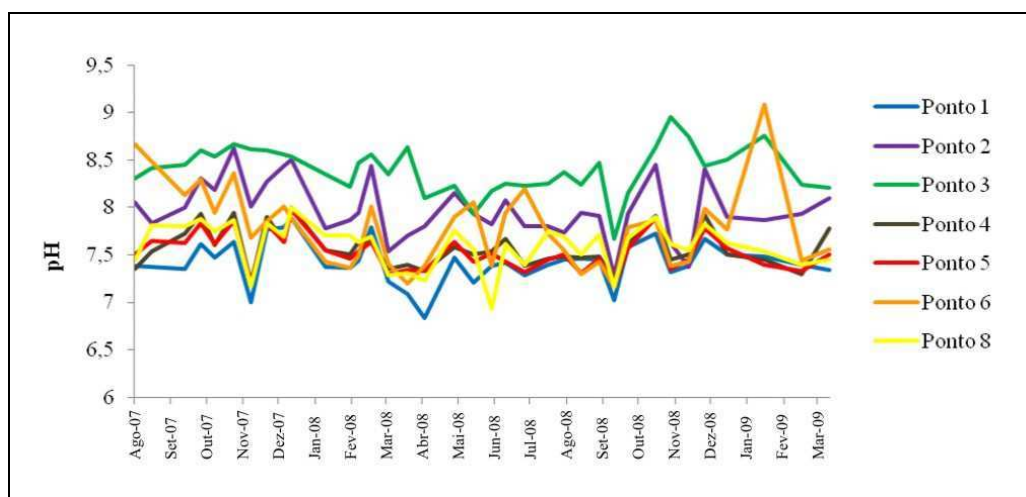
**Figura 13.** Tendência das médias das Unidades Formadoras de Colônias de fungos filamentosos em meio BDA por (mL) de amostra, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.





**Figura 14.** Tendência das médias das Unidades Formadoras de Colônias de leveduras em meio L (por mL), durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

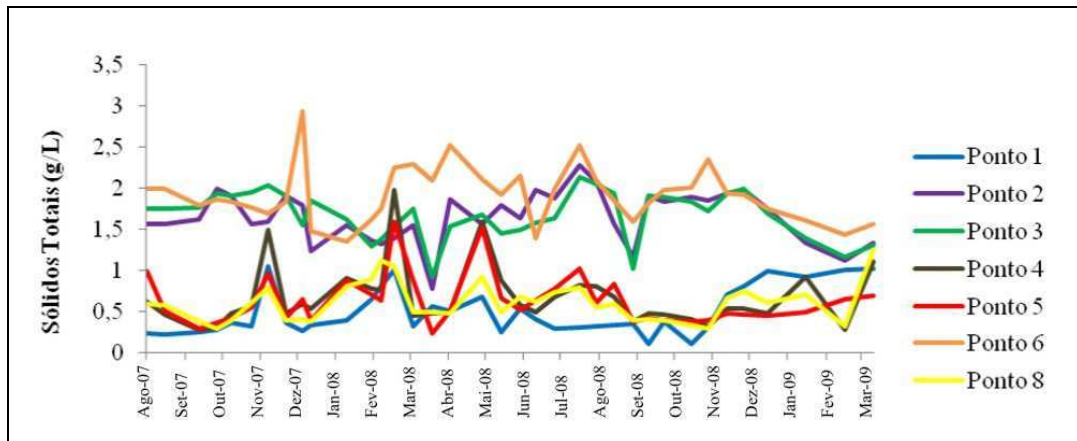
Nesta pesquisa, as amostras mantiveram-se com valores relativamente estáveis de pH tendendo a alcalinidade (Figura 15), o que não é a preferência dos fungos. Sabe-se, porém, que estes micro-organismos toleram maiores amplitudes deste parâmetro, por exemplo de 2 a 9, com valores favoráveis entre 4 e 6. Apesar de ser um fator seletivo, a maioria dos micro-organismos é insensível a variações de pH na faixa de 2 a 3 unidades (PERRY; STALEY, 1997), portanto considerou-se que o potencial hidrogeniônico não atuou como um fator crítico para a contagem do número de UFCs das espécies em estudo.



**Figura 15.** Tendência dos valores de pH das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

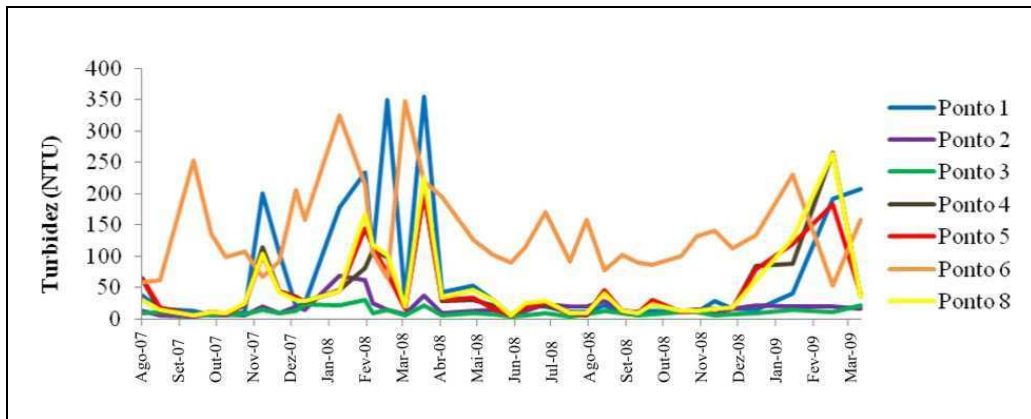
Especialmente os fungos filamentosos são capazes de se agregar a substratos sólidos e aí proliferarem. Os valores dos sólidos totais (Fig. 16), porém, não refletiram no aumento de

UFCs destes micro-organismos durante o período analisado. Os sólidos dos pontos 2, 3 e 6 não foram proporcionais ao aumento do número de fungos, talvez por se tratarem de substratos não metabolizáveis nas condições ambientais por estes micro-organismos. O período de novembro de 2008 a março de 2009 indicou uma tendência de elevação (Fig. 16), embora os pontos relativos ao efluente da refinaria tiveram menores valores, uma vez que estes pontos apresentam maiores quantidades de sais dissolvidos.



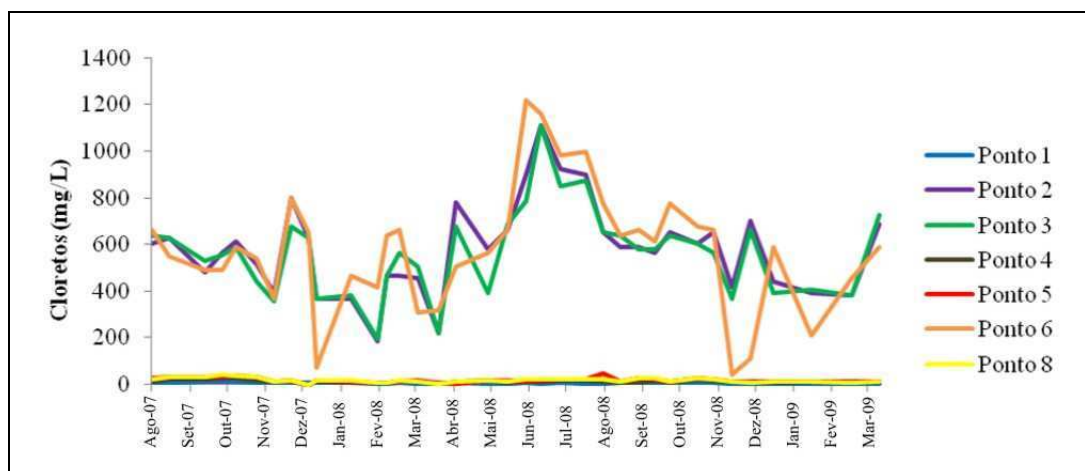
**Figura 16.** Tendência das médias de quantificação dos sólidos totais em g/L das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

A turbidez das águas pode ser atribuída a vários sólidos orgânicos e inorgânicos dispersos e à microbiota. As amostras do ponto 6 mostraram-se mais turvas (Figura 17), pois vêm do tratamento biológico do efluente bruto. A partir de abril/maio de 2008 houve tendência ao declínio, provavelmente como um resultado da melhoria dos controles do sistema de tratamento do efluente da refinaria. O rio Jaguari, no período de chuvas (de janeiro a março de 2008 e 2009) apresentou elevada turvação das águas, podendo ser uma indicação da falta de mata ciliar à montante. Além disso, o lançamento de esgotos e diversos efluentes industriais provocam elevações na turbidez das águas (CETESB, 2009 a), o que pode explicar as variações deste parâmetro nos rios com elevação na época das chuvas. Comparando-se com os resultados das UFCs, concluiu-se que estas alterações na turbidez do ponto 6 deveu-se ao aumento de sólidos e não de micro-organismos, pois como demonstrado nas Figuras 13 e 14, as contagens neste ponto e no período chuvoso foram baixas.



**Figura 17.** Tendência das médias obtidas das medições de turbidez das amostras em unidades nefelométricas de turbidez (NTU), durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

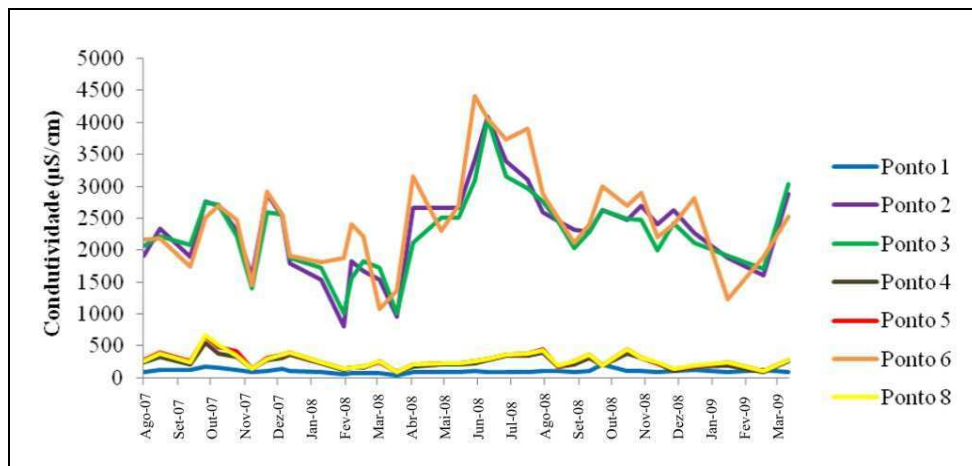
A quantidade de sais dissolvidos na água aumenta com a reutilização da mesma. Como apresentado na Figura 18, embora a refinaria de Paulínia busque diminuir os cloretos residuais dos pontos 2, 3 e 6, os mesmos ainda continuam acima dos valores encontrados nas demais amostras. De fato, uma indústria pode modificar a qualidade da água doce mediante o lançamento de seus efluentes; contudo, o ponto 8 (Fig. 18) mostrou que as atividades da refinaria não provocaram alterações significativas nos valores de cloretos do rio Atibaia, já que neste ponto, a mistura do efluente com a água do rio já ocorreu totalmente e, de acordo com os dados, as medidas de cloretos mantiveram-se praticamente nulos, semelhante aos dados do ponto 4 (a montante do descarte do efluente) e do ponto 1 (ponto de captação de água no rio Jaguari).



**Figura 18.** Tendência das médias de quantificação de cloretos em mg/L das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

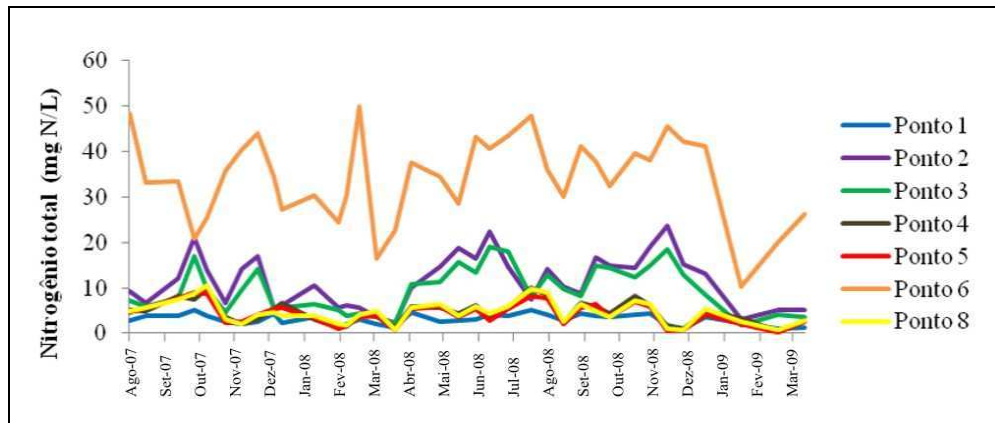


A condutividade é uma consequência da presença de substâncias ionizadas dissolvidas na água. Na Figura 19 pode-se observar que a condutividade das águas do rio Jaguari são menores do que as do Atibaia, portanto com melhor qualidade. O aumento de cloretos e da condutividade elétrica interferem no nível de pressão osmótica celular (TORTORA et al., 2007). Os resultados apresentados nas Figuras 13 e 14 mostraram que as contagens de UFCs das águas dos rios foram maiores nestas amostras.



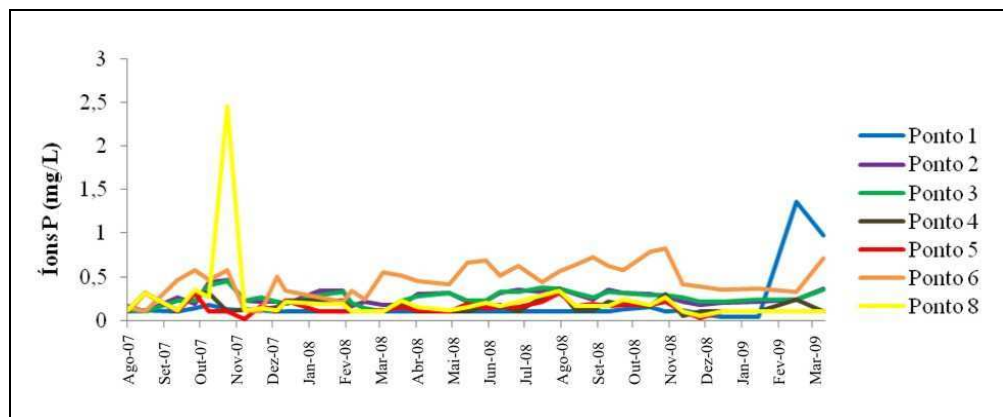
**Figura 19.** Tendência das medidas obtidas de condutividade elétrica em  $\mu\text{S}/\text{cm}$  das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

O nitrogênio foi considerado outro parâmetro de grande importância para este estudo. Sabe-se que todo micro-organismo necessita deste elemento na forma orgânica; muitos assimilam  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ . A Figura 20 mostra que o ponto 6 tem valores acima dos demais, juntamente com os pontos 2 e 3, também internos da refinaria. Outras análises (dados não apresentados), indicam que o N do efluente bruto (ponto 6) encontra-se na forma amoniacal, em sua maior parte. As tendências das UFCs dos fungos mostrou um menor número destes organismos nas amostras onde o nitrogênio apresentava-se em maior concentração, talvez porque a amônia seja mais tóxica e de difícil assimilação pelos fungos.



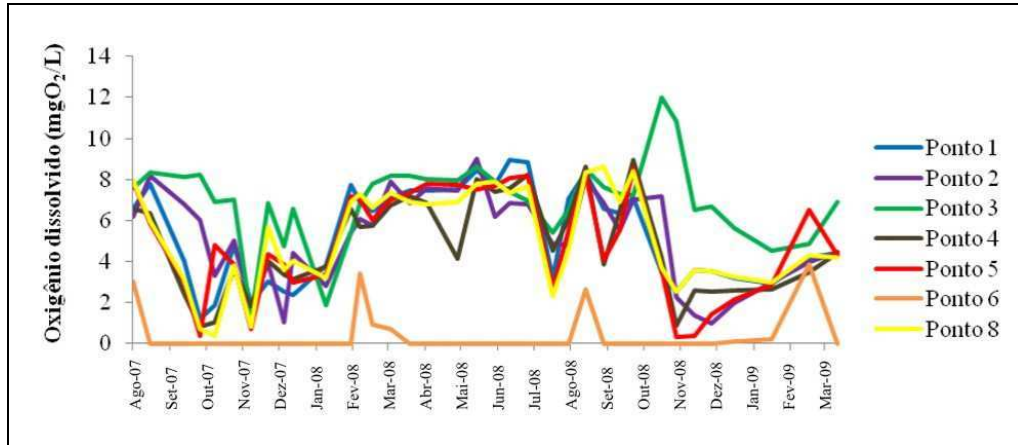
**Figura 20.** Tendência das médias de quantificação do nitrogênio total em mg de N/L das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

O maior aporte de íons P vem do efluente, porém não houve indicação da interferência deste fator nas águas do rio Atibaia (Fig. 21) pontos 4, 5 e 8. Houve oscilações, porém sempre com baixos valores.

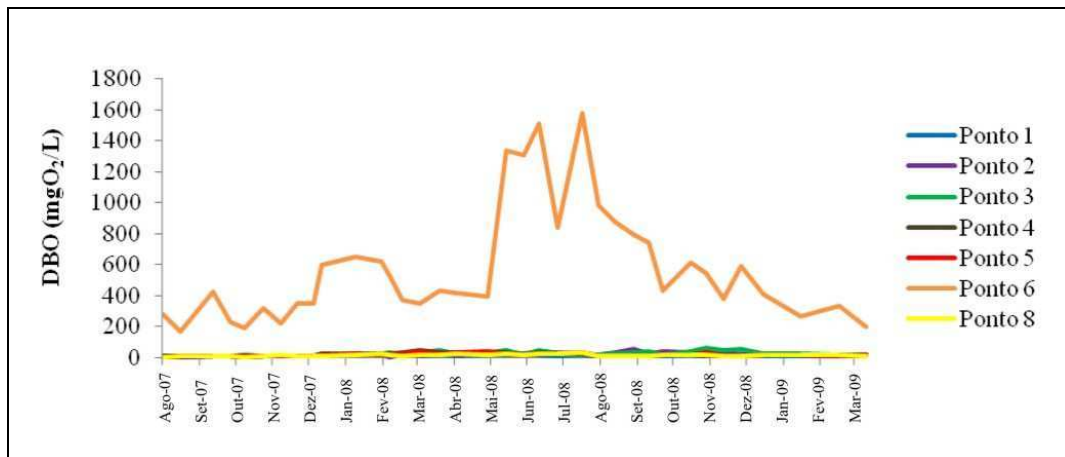


**Figura 21.** Tendência das médias de quantificação dos íons P das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

As Figuras 22 e 23 mostram as tendências de parâmetros que afetam a atividade aeróbia dos micro-organismos. Na primeira verificou-se que o ponto 6 manteve-se estável quanto à presença de  $O_2$  dissolvido, com oscilações pontuais. Nas águas dos rios, o oxigênio diminuiu nos períodos chuvosos, provavelmente em função de seu consumo pela microbiota durante o processo de decomposição da matéria orgânica, lixiviada, porém os resultados não indicaram interferência deste fator no número de UFCs (Figuras 13 e 14).



**Figura 22.** Tendência das médias de quantificação do oxigênio dissolvido ( $\text{mg O}_2/\text{mL}$ ) nas amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.



**Figura 23.** Tendência das médias de quantificação da DBO das amostras, durante as coletas entre agosto de 2007 e março de 2009.

A resolução CONAMA 357/2005 preconiza que águas de classe II devem conter no máximo  $5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ , exigência esta não atendida no efluente da refinaria (ponto 6 - Figura 23). A DBO constitui-se em análise microbiológica importante, pois pode alertar para o desequilíbrio das populações microbianas em um ambiente. A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir ao completo esgotamento do oxigênio na água, provocando o desaparecimento das formas de vida aquáticas devido ao processo de eutrofização. Um valor de DBO igual a 5,20, por exemplo, indica um incremento da microflora presente, o qual além de interferir no equilíbrio dos organismos, produz sabores e odores desagradáveis (CETESB, 2009 a). Felizmente, com exceção do ponto 6, os demais tiveram valores aceitáveis de DBO.

## 5.2. Análises estatísticas

A análise estatística descritiva mediante o emprego da correlação de Pearson apresentou valores próximos a zero (dados não apresentados). Esta análise mede o grau de correlação entre duas variáveis, que pode ser expresso como positiva, negativa ou nula (SOKAL; ROHLF, 1995). Como mencionado anteriormente, o uso de Pearson neste estudo poderia mostrar a existência de uma correlação entre as UFCs dos fungos e os parâmetros abióticos. Entretanto, todas as correlações foram praticamente nulas. Em virtude deste resultado, decidiu-se empregar a análise de variância multivariada para verificar possíveis diferenças significativas entre os pontos de coleta e a correlação canônica para dados multivariados no sentido de confirmar ou não a fraca correlação encontrada entre os parâmetros físicos e químicos e os fungos (MANLY, 2008).

Pelo resultado apresentado pelo índice *Wilk's Lambda* –  $Pr < 0,0001$  da MANOVA, verificou-se que há diferenças entre os pontos de coleta, embora cada parâmetro promova o mesmo efeito independentemente do local. A diferença se baseia nas diferentes combinações dos parâmetros apresentadas por cada ponto, conforme as características que apresentam. A partir de então, aplicou-se a análise de correlação canônica para dados multivariados, na qual os parâmetros de UFC de fungos corresponderam às variáveis dependentes (fatores bióticos) e os físicos e químicos às independentes (fatores abióticos). Para fins interpretativos, foram considerados significativos valores  $< -0,5$  e  $> 0,5$ , e aceitáveis aqueles  $\leq -0,45$  e  $\geq 0,45$ .

As análises revelaram diferentes influências dos parâmetros independentes sobre as contagens da micota: alguns foram interpretados conjuntamente, pois apresentaram relações de dependência entre si no ambiente; outros tiveram pouca ou nenhuma influência sobre a presença de UFCs nos pontos de coleta. Os dados sobre estação e pluviosidade estão intimamente relacionados e nas análises de correlação canônica apresentaram efeitos semelhantes. A pluviosidade provoca diluição no corpo d'água e, conseqüentemente, diminuição dos valores dos parâmetros químicos mensurados, podendo ainda diminuir a temperatura. No entanto, as águas pluviais junto com outros fatores transferem os fungos presentes no solo e suspensos no ar para o rio.

A região em questão não apresenta estações climáticas bem definidas, mas sim períodos de seca e de chuvas (Fig. 11). Esses dados, juntamente com as médias de temperatura (Fig. 12) não influenciaram na presença ou ausência de fungos nos pontos de coleta.

Os valores de pH de 6,83 a 9,09 pareceram não influenciar de forma significativa o número de leveduras. Sabe-se que estes micro-organismos são tolerantes a grandes faixas de

variação de pH e são preferencialmente acidófilos (TORTORA et al., 2007), como mencionado anteriormente. Assim, houve coerência entre os resultados dos testes estatísticos e as tendências deste parâmetro (Fig. 15).

Os dados de sólidos totais – orgânicos e inorgânicos – (Fig. 16) perfazem o somatório dos valores de sólidos sedimentáveis e dos sólidos solúveis em suspensão, matéria orgânica volátil e resíduo fixo (a 550°C). Tais sólidos podem ou não influenciar na turbidez da água (Fig. 17), que corresponde ao grau de diminuição da intensidade que o feixe de luz sofre ao atravessá-la. Outros fatores que influenciam na medida da turbidez são os detritos orgânicos, presença de algas, bactérias e cianobactérias, plâncton em geral, fungos (micélios, esporos, células leveduriformes), erosão das margens, despejo de efluentes domésticos e industriais (CETESB, 2009a). Sabe-se que a maior parte dos sólidos dissolvidos nas águas do Rio Atibaia é constituída de sais minerais (ANGELIS et al., 2008). Os fungos podem ancorar-se nas partículas dos sólidos em suspensão metabolizáveis colonizando-as, ao mesmo tempo que promovem a sua degradação induzindo a clarificação da água.

A análise multivariada, no entanto, não revelou a influência destes parâmetros sobre as populações de fungos filamentosos e leveduras nos diferentes pontos de coleta, como poder-se-ia esperar. A análise realizada privilegia os parâmetros mais fortemente influentes, podendo sobrepor a influência de outros. A condutividade elétrica da água refere-se à concentração iônica nela presente e, sabendo-se que as águas doces possuem baixas concentrações de sais, em geral admite-se que os cloretos (Fig. 19) são acrescentados com maior frequência às águas após o uso antrópico. Os cloretos são os sais mais comuns também no efluente das indústrias de petróleo (CETESB, 2009a) e a condutividade é uma consequência da quantidade de sais dissolvidos na água. Os fungos em geral não toleram níveis elevados de sais e, dessa maneira, o alto teor de cloretos pode influenciar negativamente na sua viabilidade. Angelis et al. (2008), em uma pesquisa iniciada em 1997, mostraram que o Rio Atibaia tem nos seus níveis de cloreto o parâmetro que apresentou maiores alterações, interferindo negativamente sobretudo na comunidade microbológica.

Níveis de condutividade superiores a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  indicam ambientes impactados e os níveis de cloreto não devem ultrapassar a concentração de 250 mg/L para a água de rio classe II (CONAMA, 2005). Os cloretos deixam a água com gosto e quando o sal é de sódio induz sabor salgado. Alta salinidade pode provocar problemas às pessoas hipertensas e com doenças renais (ANGELIS et al., 2008; CETESB, 2009a). O Rio Jaguari apresentou aumento da salinização por cloretos em 43,13% entre maio de 2005 e abril de 2006, quando comparado

com o período entre agosto de 2007 e abril de 2008. No Rio Atibaia o aumento foi de 20,1% no mesmo período (ANGELIS et al., 2008).

Conforme a análise de correlação canônica, os níveis de condutividade e dos cloretos foram inversamente proporcionais às contagens de fungos filamentosos e leveduras, mostrando que de fato influenciaram na presença desses micro-organismos. No ponto 1, referente ao Rio Jaguari, a influência da condutividade elétrica e dos cloretos foi aparentemente menor sobre a presença de fungos.

Quanto ao NT, este compreende o somatório das concentrações de amônia, nitritos e nitratos nas amostras e foi observado que tal parâmetro sofreu influência dos altos níveis de amônia, encontrados no efluente bruto da refinaria no ponto 6 (ANGELIS et al., 2009). A presença de NT em altas concentrações, assim como o fósforo, confirma a existência de lançamentos no rio de esgotos domésticos e industriais. No efluente doméstico há grande quantidade de nitrogênio na forma reduzida (nitrogênio orgânico, presentes nas proteínas) e amônia (devido à hidrólise da uréia), além de fosfatos orgânicos presentes nos esgotos urbanos. Esses mesmos compostos podem ocorrer também em diversos tipos de efluentes industriais, inclusive nos de indústrias petroquímicas, como no caso em questão. As concentrações destas formas podem revelar o estado de poluição em um rio, pois as zonas de autodepuração natural apresentam predominância de nitrogênio orgânico próximo à fonte de degradação, forma amoniacal na área de decomposição ativa, nitrito na zona de recuperação e nitrato nas águas limpas (CETESB, 2009a).

O nitrogênio é um macronutriente essencial aos seres vivos, pois faz parte da constituição dos aminoácidos que compõem as proteínas e, assim como o fósforo, participa do material genético e energético (CARVALHO; CARVALHO, 1974; CETESB, 2009a). Altas quantidades de nitrogênio lançadas no rio juntamente com fontes de fósforo e outros nutrientes provocam o processo de eutrofização da água, elevando a quantidade de algas e outros organismos que aproveitam esses nutrientes, comprometendo a utilização dessas águas para abastecimento de consumo humano. Os fungos possuem a capacidade de utilizar tanto fontes orgânicas quanto inorgânicas de nitrogênio para sua nutrição; no entanto, essa habilidade pode variar em função do grupo fúngico em questão (LILLY; BARNETT apud CARVALHO; CARVALHO, 1974).

Os nitratos são as principais fontes inorgânicas assimiláveis de nitrogênio, porém existem fungos que assimilam em menor escala a forma amoniacal, como exemplo o gênero *Penicillium sp.* (CARVALHO; CARVALHO, 1974). A amônia, em concentrações elevadas, é tóxica aos organismos e pode inibir o crescimento de fungos, como no caso do *Colletotrichum*

*gossypii* South var. *cephalosporioides* (CARVALHO; CARVALHO, 1974). Atualmente, considera-se 5 mg/L a concentração máxima de amônia tolerada por inúmeras espécies de peixes, portanto, não deve ultrapassar essa concentração nos corpos d'água. Além de ser tóxica, consome o OD da água ao ser oxidada por via biológica (CETESB, 2009a).

As análises de correlação canônica para o parâmetro nitrogênio total indicaram uma relação inversamente proporcional sobre a presença de fungos: maior valor de nitrogênio total implicou em um menor número de UFCs. Este resultado pode ser explicado baseando-se na informação de Angelis et al. (2009) que observaram o alto conteúdo de amônia nas amostras, a qual é geralmente tóxica aos micro-organismos. Se a maior fração do nitrogênio total fosse composta de nitrato, provavelmente a relação teria sido positiva, já que o mesmo é facilmente assimilável pela maioria das espécies fúngicas.

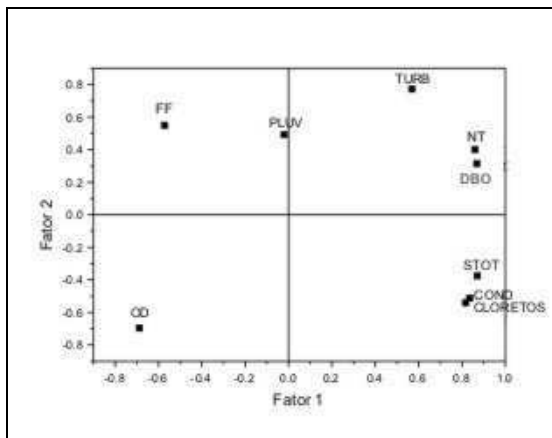
Com relação ao fósforo, as concentrações médias nos esgotos sanitários do Brasil encontram-se entre 6 e 10 mg P/L. Apesar do ponto 6 ter apresentado níveis médios de íons P relativamente mais elevados que nos outros pontos (Fig. 21), ainda encontram-se dentro da média aceitável, pois não ultrapassam o valor de 1,5 mg P/L. Mesmo assim, após o tratamento do efluente (pontos 2 e 3), os níveis baixaram, sendo liberadas no rio quantidades menores. As análises de correlação canônica não apontaram grande influência dos íons P sobre a micota, talvez por não ter atingido concentrações que, de fato, pudessem afetá-la diretamente.

Outro parâmetro indicado para avaliação da qualidade da água é o OD. Sua baixa concentração (Fig. 22) pode indicar que o ambiente está eutrofizado devido à poluição por despejo de nutrientes orgânicos que, concomitantemente, induz aumento da microbiota e da demanda de oxigênio por parte dos seres aeróbios. A quantidade de matéria orgânica que atinge os rios é medida pela DBO (Fig. 23), pois corresponde à quantidade de oxigênio necessária para promover a sua oxidação com auxílio do metabolismo dos micro-organismos aeróbios para uma forma estável. Altos valores de DBO podem diminuir a transformação da amônia por micro-organismos, pois a sua oxidação demanda gasto de oxigênio (CETESB, 2009b).

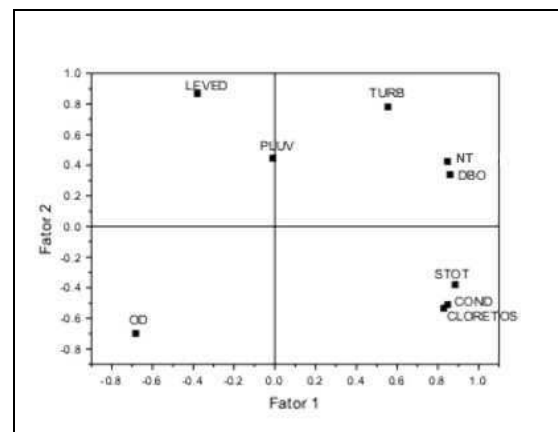
Nas análises de correlação canônica, não foi possível efetuar correlação entre as médias de OD e DBO com os dados sobre os fungos. Em geral, OD e DBO consistem em fatores inversamente proporcionais, sendo dependentes entre si. Considerando-se tal fato, o aumento de OD e a consequente diminuição de DBO deveria estimular o aumento de UFCs de fungos, uma vez que são organismos predominantemente aeróbios, do mesmo modo que a situação inversa deveria provocar a diminuição da contagem de UFCs. No entanto, a análise de correlação canônica não apresentou relação entre os dados de OD e DBO, além de

demonstrar que a ausência dos dois fatores influencia na contagem das UFCs. Esses dados podem sugerir que tais parâmetros sejam dependentes de outros que não tenham sido investigados neste estudo. Considera-se ainda que essa correlação inversamente proporcional seja apenas coincidência, pois os fungos encontrados nas análises são transientes e, de fato, não influenciam de forma significativa na presença ou ausência destas variáveis no referido ambiente.

As figuras 24 e 25 correspondem, respectivamente, à análise dos componentes principais que podem ter influenciado os fungos filamentosos e as leveduras. Observou-se uma grande similaridade nos resultados obtidos nos dois grupos de micro-organismos, permitindo inferir que os parâmetros bióticos respondem de maneira semelhante aos mesmos estímulos. As análises mostraram que sólidos totais, condutividade elétrica da água e concentração de cloretos foram inversamente proporcionais aos parâmetros de contagens de UFCs, concordando com os dados das correlações canônicas. Outra concordância entre estas duas análises estatísticas foi encontrada nos resultados da pluviosidade.



**Figura 24.** Análise dos componentes principais dos parâmetros físicos, químicos e contagem de fungos filamentosos dos pontos estudados na região de Paulínia, SP, Brasil.



**Figura 25.** Análise dos componentes principais dos parâmetros físicos, químicos e contagem das leveduras dos pontos estudados na região de Paulínia, SP, Brasil.

**Legenda:**

FF: Fungos filamentosos

LEVED: leveduras

TURB: turbidez

NT: nitrogênio total

DBO: demanda bioquímica de oxigênio

PLUV: pluviosidade

OD: oxigênio dissolvido

STOT: sólidos totais

COND: condutividade

CLORETOS: cloretos



**Tabela 2:** Resultados da análise dos componentes principais dos parâmetros físicos, químicos e contagem de fungos filamentosos geradas SAS 9.1.3

Variável	Fator 1	Fator 2
PLUV	-0,01989	0,491254
COND	<u>0,836297</u>	-0,51327
STOT	<u>0,871718</u>	-0,37626
TURB	<u>0,569266</u>	0,770636
OD	<u>-0,68778</u>	-0,69701
DBO	<u>0,868932</u>	0,313553
CLORETOS	<u>0,817983</u>	-0,54051
NT	<u>0,860326</u>	0,39982
FF	<u>-0,57061</u>	0,548586
Variabilidade (%)	0,54377	0,296054

**Legenda:** Valores sublinhados indicam componentes com significância maior que 0,5, considerados relevantes para a análise, do fator de maior variabilidade. Legenda: PLUV: pluviosidade, OD: oxigênio dissolvido, COND: condutividade, DBO: demanda bioquímica de oxigênio, STOT: sólidos totais, CLORETOS: cloretos, TURB: turbidez, NT: nitrogênio total, FF: fungos filamentosos.

**Tabela 3:** Resultados da análise dos componentes principais dos parâmetros físicos, químicos e contagem de leveduras geradas SAS 9.1.3

Variável	Fator 1	Fator 2
PLUV	-0,00936	0,444155
COND	<u>0,849254</u>	-0,51132
STOT	<u>0,885867</u>	-0,38187
TURB	<u>0,556116</u>	0,780147
OD	<u>-0,68183</u>	-0,69883
DBO	<u>0,860393</u>	0,338081
CLORETOS	<u>0,830364</u>	-0,53556
NT	<u>0,84848</u>	0,424104
LEVED	-0,37951	0,867365
Variabilidade (%)	52,83	33,91

**Legenda:** Valores sublinhados indicam componentes com significância maior que 0,5, considerados relevantes para a análise, do fator de maior variabilidade. Legenda: PLUV: pluviosidade, OD: oxigênio dissolvido, COND: condutividade, DBO: demanda bioquímica de oxigênio, STOT: sólidos totais, CLORETOS: cloretos, TURB: turbidez, NT: nitrogênio total, LEVED: leveduras.

Os resultados analisados indicaram que o efluente industrial da refinaria de Paulínia, liberado no Rio Atibaia não provocou alterações significativas no número de UFCs de fungos filamentosos e de leveduras, no período estudado. Foi possível notar alterações significativas no ponto 6 (efluente bruto), coletado no interior da refinaria. Entretanto, os pontos a montante (4) e a jusante (5 e 8) foram semelhantes na maioria dos parâmetros estudados. Isto indica que o tratamento realizado pela refinaria tem sido satisfatório, como pode ser observado nas

análises dos pontos 2 e 3, em que a maioria dos parâmetros se encontram estabilizados, com exceção dos cloretos e condutividade, cuja redução ainda pode ser melhorada.

## 6. CONCLUSÕES

# As análises químicas e físicas realizadas sugeriram que o efluente da refinaria de Paulínia não representou um fator impactante nas contagens de UFCs de fungos transientes encontrados no rio Atibaia, durante o período estudado;

# No período de chuvas houve o aumento das UFCs de fungos filamentosos e de leveduras nos rios Atibaia (pontos 4, 5 e 8) e Jaguari (ponto 1).

# Baseando-se nas médias de temperatura das águas do rio Atibaia, pode-se concluir que o mesmo constitui um ambiente apropriado para o estudo de espécies microbianas mesofílicas.

# As médias de pH das águas do rio Atibaia indicam que o mesmo constitui um local favorável ao isolamento de espécies microbianas habituadas a um ambiente que tende à alcalinidade.

# A microbiota transiente detectada no período estudado foi sensível aos parâmetros cloreto, sólidos totais, condutividade, turbidez e nitrogênio total, pois estes fatores abióticos influenciaram negativamente na contagem de UFCs dos fungos.

# Os parâmetros pH, temperatura e íons P foram neutros em relação aos parâmetros microbiológicos analisados.

# A análise de correlação de Pearson pareceu não ser eficiente para estudos ambientais sujeitos a muitas variações.

# Mediante os resultados, é possível afirmar que apesar do descarte do efluente, os parâmetros bióticos analisados do rio Atibaia não sofrem influência significativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, G. C. **The fungi**: an advanced treatise. Introduction and keys to higher taxa. New York: Academic Press, 1973. 348 p.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. Hoboken: John Wiley & Sons, Pub., 1996. 233 p.

ANGELIS, D. de F. **Contribuição da Microbiologia em Estudos sobre o Rio Atibaia (Região de Campinas) SP**. 2009. 122f. Tese (Livre-Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ANGELIS, D.F. et al. Avaliação da toxicidade (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do Rio Atibaia na região de influência do lançamento. **REPLAN – Relatório técnico final**. 2008. 220f.

ANGELIS, D.F. et al. Avaliação da toxicidade (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do Rio Atibaia na região de influência do lançamento. **REPLAN – Relatório técnico final**. 2009. 248f.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D.R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, n.38, p. 248-252, 2007.

BÄRLOCHER, F.; KENDRICK, B. Dynamics of the Fungal Population on Leaves in a Stream. **The Journal Of Ecology**. Oxford, v. 62, n. 3, p.761-791, 1974. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2258954>>. Acesso em: 02 set. 2009.

BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **The Journal Of Biotechnology**. Amsterdam, p. 101-107, 1998.

CARVALHO, Y.; CARVALHO, C.G.S. Comportamento do fungo *Colletotrichum gossypii* South. var. *cephalosporioides* Costa em substrato com diferentes fontes de nitrogênio (1). **Anais da E.A.V. – UFGO.** – Ano IV, nº 1, p. 1-12, 1974.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 26 set. 2009a.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo**. Série Relatórios. Apêndice B. Índices de qualidade das águas, critérios de avaliação da qualidade dos sedimentos e indicador de controle de fontes. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 27 set. 2009b.

CGEE – CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Ciência, tecnologia e inovação**. Disponível em: <[www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752](http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752)>. Acesso em: 27 jul. 2009.

CLESCERI, L.S.; REENBRRG, A.E.; EATON, A.D. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater**. 20th Edition, 1998. Prepared and published by APHA; AWWA and WEF. Washington.

CONAMA – 357/2005. RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, nº 53, Seção 1, p. 58-63, 2005.

CONCEIÇÃO, D.M. et al. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.4, p.99-106, 2004.

D'ANNIBALE, A. et al. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, vol. 72, n. 1, p. 28-36, 2006.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, v. 1, 1993. 120p.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.** Cambridge, n. 95, p. 641-55, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. et al. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8 ed. Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1995. 616p.

HOFRICHTER, M.; GÜNTHER, T.; FRITSCHÉ, W. Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. **Biodegradation**. Dordrecht, v.3, p.415-421, 1993.

HOPKINS, D.W. Book reviews: Biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Ecology**. Oxford, v. 33, n. 1, p. 178-179, 1996. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2405028>>. Acesso em: 08 ago. 2009.

KORDA, A. et al. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, n. 48, p. 677-686, 1997.

MACEDO, R.C. et al. **Biorremediação de solos impactado por óleo cru utilizando fungos filamentosos**. Disponível em: <[http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_X\\_jic\\_2002/Victor.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_X_jic_2002/Victor.pdf)>. Acesso em: 08 set. 2009.

MACHADO, A.P.S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente Escola de Engenharia da Universidade do Minho**. Departamento em Engenharia Biológica, 2006. 116f.

MANLY, B.J.F. Análise de correlação canônica. *In: Métodos estatísticos multivariados: uma introdução*. Tradução de: S. I. C. Carmona. Porto Alegre: Artmed Bookman. 3ª. ed, p.157-176, 2008.

PERRY, J.J.; STALEY, J.T. **Microbiology: dynamics and diversity**. Saunders College Publishing. Fort Worth, 1997. 127p.

PIÃO, A.C.S. et al. Modelo estatístico para avaliar tendências mediante análise dos parâmetros do cálculo do índice de qualidade de água. **8th Brazilian Conference on Dynamics, control and applications**. 2009.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**. São Paulo, vol. 25, suppl.1, 2002.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X. **Growth of fungi on volatile aromatic hydrocarbons: environmental perspectives**. 2002. 115p. Thesis (PhD). Wageningen University, Wageningen.

SEADE – FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS. **Demográfico – estatísticas vitais do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/spdemog/>>. Acesso em : 17 fev. 2010.

SILVA, G. S.; JARDIM, W.F. Um novo índice de qualidade das águas para proteção da vida aquática aplicado ao Rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia – SP. **Quím. Nova.** São Paulo, v. 29, n. 4, p. 689-694, 2006.

SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation.** New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. 592p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.L. **Biometry.** 3<sup>a</sup>. ed. New York: W.H Freeman And Company, 1995. 887p.

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia.** 8 ed. Revisão técnica de: M. H. Vainstein; A. Schrank. Porto Alegre: Artmed, 2007. 894 p.

UETA, J. et al. **Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação Microrganismos degradadores do herbicida Atrazina.** 1999. Disponível em: <[http://www.rsa.ind.br/midia/biodegrada%E7%E3o\\_biorremedia%E7%E3o.pdf](http://www.rsa.ind.br/midia/biodegrada%E7%E3o_biorremedia%E7%E3o.pdf)>. Acesso em: 26 ago. 2009.

VASCONCELOS, W.E. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** v. 3, n. 2, 2003. Disponível em: <<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/fungos.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

WAINWRIGHT, M. Novel uses for fungi in biotechnology. **Chem. Ind.** London, v. 2, p. 31-4, 1990.

## **CAPÍTULO 2**

# **FOTODOCUMENTAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS NA REGIÃO DE PAULÍNIA, SP.**



## RESUMO

Os fungos possuem importância significativa para a economia humana graças ao papel fundamental que desempenham na natureza e ao potencial de aplicação que apresentam. Os dados de base, tais como diversidade, distribuição e ecologia dos micro-organismos ainda são escassos, notadamente de fungos. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo fotodocumentar e preservar fungos transientes coletados em amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari, bem como no efluente de uma refinaria petroquímica, na região de Paulínia, SP, e depositá-los na coleção de culturas do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro, SP. Ao todo, foram realizadas 36 coletas de amostras entre agosto de 2007 e março de 2009, sendo 3 pontos no pólo petroquímico, 3 pontos no Rio Atibaia e 1 ponto no Rio Jaguari, este tomado como referência, totalizando 252 amostras. O método de isolamento seguiu Clesceri et al. (1998). Após a purificação, as estirpes foram preservadas em tubos com meio de cultura inclinado a 10°C em *ultrafreezer* a -80°C. Para a identificação fez-se o exame direto da placa sob estereomicroscópio, observação microscópica, microcultivo, provas bioquímicas e, em alguns casos, utilizou-se o sequenciamento da região ITS e de D1/D2 do rDNA. Das 314 estirpes isoladas, 51 não sobreviveram, 63 se mantiveram estéreis e 33 ainda se encontram em fase de identificação; 167 estirpes, dentre elas fungos filamentosos e leveduras, distribuíram em 57 táxons, sendo 47 espécies a partir de 38 gêneros. Alguns dos gêneros de fungos encontrados foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces*. A pesquisa mostrou que importantes projetos podem ser formulados a partir dos resultados aqui obtidos. Por exemplo, em virtude de seus fatores de virulência, a ocorrência da espécie *Candida parapsilosis*, encontrada exclusivamente nas amostras de água do rio Jaguari, o qual abastece a refinaria, deve ser investigada. Pela frequência de aparição e pela sua associação a casos de infecção humana, a ocorrência do fungo *Microsphaeropsis arundinis* também deve servir como objeto de nova investigação. O potencial para biorremediação das espécies que ocorreram principalmente nas amostras do efluente bruto pode ser explorado. Além dessas contribuições, a ficha catalográfica assumiu reformulação de padrão de apresentação, proposto ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

## ABSTRACT

Fungi are of relevant importance due to their role in nature and applicability to human society. Data about diversity, distribution and ecology of microorganisms are still scarce, mainly in fungal domain. This work aimed to isolate, characterize and photo-document the transient mycota of water samples collected from the rivers Atibaia and Jaguari, in the surroundings of a petrochemical refinery in Paulínia, São Paulo, and to deposit the strains in the culture collection located in the Center of Studies of Social Insects, UNESP, Rio Claro, SP. Thirty-six samplings were taken between August 2007 and March 2009 in 3 places of the refinery, 3 in Atibaia river and one in the Jaguari river, which was considered a reference, with a total of 252 samples. The isolation method was based on Clesceri et al. (1998). After purified, the strains were preserved in slants at 10°C and by ultra-freezing technique, at -80°C. The identification process followed observation under stereo microscope, study of squash mounts, slide culture, physiological tests and rDNA sequencing of the ITS and D1 and D2 regions. From 314 strains isolated, 51 did not survive, 63 did not sporulate and 33 are still to be identified; 167 strains among filamentous fungi and yeasts were distributed in 47 species from 38 genera. Some fungi reported were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Candida*, *Pichia* and *Saccharomyces*. The results showed that this research acted as the starting point of important projects. For instance, the exclusive occurrence of opportunistic species *Candida parapsilosis* in the Jaguari river samples should be investigated, due to its use inside the refinery. *Microsphaeropsis arundinis*, also associated to human infections may be a target of studies. The bioremediation potential of the isolates obtained from the effluent should be tested. Finally, this study contributed with a suggestion of a standardized ID form for the culture collection.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos únicos que apresentam formas extremamente diversas e estilos de vida singulares. São geralmente compostos de filamentos tubulares, denominados hifas, que funcionam como unidade básica de seus corpos de frutificação, os quais podem constituir estruturas simples ou complexas. São heterotróficos e obtêm alimentação a partir da matéria orgânica inanimada ou nutrindo-se como parasitas (TORTORA et al., 2007; WEBSTER, 1986). Apresentam alta plasticidade, sendo que a maioria possui células totipotentes, de modo que uma nova colônia pode surgir a partir de esporos e conídios e também de fragmentos de hifas (SINGH, 2006). Algumas espécies, particularmente as patogênicas, apresentam um fenômeno de transição entre as fases micelial e leveduriforme, conhecido como dimorfismo, dependente das variações ambientais (ALEXOPOULOS et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2003).

Os produtos microbianos representam cerca de 50 a 100 bilhões de dólares anuais no mercado global, considerado pouco diante do potencial biotecnológico que possuem (CGEE, 2009). Uma parte representativa desse montante refere-se à aplicação dos fungos em diversas áreas como na utilização industrial, em processos fermentativos (fabricação de etanol e bebidas como cerveja e vinho), na produção de antibióticos, vitaminas e ácidos orgânicos, na fabricação de pães, no amadurecimento de queijos, na bioconversão de produtos, na degradação de cianetos, na produção de biomassa e biocombustíveis, na biorremediação de solos, no controle biológico e como bioindicadores, na produção de enzimas lignocelulolíticas, dentre outros. Essa vasta aplicação biotecnológica apenas reflete o papel fundamental que desempenham na natureza (CABUK; UNAL; KOLANKAYA, 2006; HAWKSWORTH et al., 1995; SÁNCHEZ, 2009; WAINWRIGHT, 1990). O crescimento dos fungos também pode ser prejudicial, como no caso do apodrecimento da madeira, dos tecidos, dos alimentos e de certos artigos comerciais, resultando em efeitos adversos sobre a economia humana (HAWKSWORTH, 1992).

A literatura menciona que os fungos constituem o segundo maior grupo de organismos no mundo (HAWKSWORTH, 1991; 2001). Em 1991, Hawksworth estimou existir aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos, das quais apenas 69.000 haviam sido descritas. Esse cálculo baseou-se na proporção de fungos relacionados a plantas vasculares da Inglaterra, onde se considera que o levantamento da biodiversidade fúngica é um dos mais completos do mundo. Apesar de esta estimativa ser atualmente apontada como conservadora,

ainda não foi possível o desenvolvimento de estudos que esclareçam a questão mais concretamente (HAWKSWORTH, 2001).

Os dados de base, tais como diversidade, distribuição e ecologia dos micro-organismos ainda são escassas, notadamente de fungos. Faz-se necessário promover estudos e formação de pessoal especializado que objetivem maior desenvolvimento e conhecimento da área. Este trabalho retrata um esforço neste sentido.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os primeiros levantamentos sobre fungos no Brasil ocorreram somente a partir de 1809. Foram realizados por pesquisadores estrangeiros conhecidos como “botânicos viajantes”, os quais trouxeram grande avanço para o conhecimento da comunidade de fungos no Brasil. Na época, diversos espécimes macroscópicos e líquens foram coletados graças à iniciativa dos países europeus, considerados os pioneiros na área de documentação destes organismos e plantas no mundo. Entretanto, o envio de grande parte do material aqui coletado para outros países, como a Alemanha, resultou em perdas irreparáveis para as nossas coleções de cultura (FIDALGO, 1968).

Foi no século XVI que a taxonomia tornou-se ciência, e a partir de então houve rápido aumento no número de plantas e animais terrestres que passaram a ser conhecidos (CGEE, 2009). Entretanto, pouco se investiu em sistemática e em ecologia microbiana, o que resultou em grande lacuna científica nesta área. Segundo Hawksworth (1992), a carência de informações sobre os micro-organismos deve-se, dentre outros motivos, às dificuldades encontradas para as suas classificações.

A caracterização morfológica das estruturas reprodutivas e sua comparação com as descrições das chaves taxonômicas constituiu base fundamental para a identificação da maioria das espécies de fungos por décadas. No entanto, pontos divergentes entre os autores destas obras tornaram a identificação clássica muito frágil em diversos grupos. Um dos problemas tem sido a dificuldade em se empregar o conceito de espécie para os fungos, e a distinção entre indivíduo e população fúngica (ARX, 1974; BARNETT; HUNTER, 1972; GEISER et al., 2007; GUARRO et al., 1999). Além disso, alguns táxons possuem fases teleomórfica (sexuada) e anamórfica (assexuada), os quais outrora foram classificados como espécies diferentes, embora apresentem mesmo genótipo (CARLILE; WATKINSON, 1996).

De acordo com o entomólogo alemão Willi Henning, em 1950, a classificação dos organismos deveria estar relacionada com a compreensão do parentesco genético e a diversidade seria resultante da ramificação dos ancestrais em espécies descendentes, de modo que as características utilizadas para definir as espécies nos sistemas de classificação surgiriam no decurso da filogenia. Esta permite a compreensão da evolução de todos os caracteres, e, dessa maneira, a classificação biológica deveria tomá-la por base (KRIEGER et al., 2009).

É importante lembrar que os sistemas de classificação existentes baseiam-se apenas nos 7% de espécies de fungos descritas atualmente. A maioria delas vem de regiões do

planeta com diversidade menor de espécies, clima e de ambiente, o que nos demonstra serem sistemas limitados e com nível de confiança atenuado. Pelas expectativas da existência de mais de 90% de espécies ainda não conhecidas, seria necessário acomodar de algum modo essas novas espécies em tais descrições, o que também expressa a falta de conhecimento sobre a ecologia de inúmeros fungos tropicais (HAWKSWORTH, 2001).

Suh e colaboradores (2005) isolaram cerca de 650 leveduras do trato digestório de uma variedade de besouros por um período de mais de três anos, do sudeste dos Estados Unidos e da Ilha Barro Colorado, no Panamá. Destas leveduras, mais de 200 eram espécies ainda não descritas, o que correspondia a aproximadamente 30% de todas as espécies de leveduras descritas até então. Evidências indicaram que a maioria das espécies desconhecidas deve ser encontrada nas zonas tropicais, principalmente em florestas pluviais como Amazônia e Mata Atlântica, uma vez que uma única árvore pode abrigar centenas de insetos, e cada um deles, por sua vez, pode abrigar outras centenas de micro-organismos (HAWKSWORTH, 1991, 2001; MACHADO, 2006).

Até então, aproximadamente 74.000 espécies foram descritas, o que corresponde a aproximadamente 7% do total estimado; porém, cerca de 900 a 1.200 novas espécies são descritas anualmente (MACHADO, 2006). Embora o Brasil seja considerado um dos países com maior diversidade biológica do mundo, possuindo cerca de 20% das espécies animais e vegetais do planeta (KRIEGER et al., 2009), pouco se sabe sobre sua diversidade microbiana. Essa escassez de dados deve-se a diversos fatores, dentre eles ao fato de haverem micro-organismos não cultiváveis nos meios de cultura tradicionais, à dificuldade de identificá-los apenas morfológicamente, ao conhecimento defasado quanto à distribuição e dispersão das espécies (GOI; SOUZA, 2006), por algumas limitações dos próprios pesquisadores e pela falta de apoio dos órgãos governamentais (CGEE, 2009; SINGH, 2006).

Outra prioridade para a manutenção da biodiversidade é a preservação dos organismos. A melhor maneira de preservar as espécies é, sem dúvida, a conservação *in situ*. Acredita-se que micro-organismos estão desaparecendo antes mesmo de serem descobertos devido à devastação de seus habitats naturais, principalmente os que vivem associados a inúmeras plantas, insetos e outros organismos, sejam eles endêmicos ou não. Devido a perturbações ambientais, o fungo *Penicillium clavariaeformis* desapareceu juntamente com a extinção da espécie arbórea do gênero *Diospyros* da Indonésia, na qual vivia (COLWELL, 1997). Além desses fatores, a conservação dos recursos genéticos no seu ambiente natural requer menos recursos financeiros que uma conservação *ex-situ*, por exemplo, o que ressalta a vantagem da preservação ambiental. Esta alternativa beneficiaria diretamente os países menos

desenvolvidos e com menores condições financeiras, onde a maior biodiversidade do planeta se concentra (KRIEGER et al., 2009).

No entanto, apesar de mais dispendiosa, a conservação *ex-situ* também é necessária. As coleções de culturas microbianas constituem exemplos desse tipo de conservação. Funcionam como um banco genético onde são depositadas culturas dos mais variados tipos e origens, tais como as de interesse industrial, ambiental, as patogênicas e as de material-testemunho utilizadas em pesquisas. Suas criações foram estimuladas principalmente a partir dos anos 1970 pela International Depository Authority (IDA) para que fossem depositados os micro-organismos envolvidos em patentes. São também locais de referência, pois abrigam informações sobre os micro-organismos preservados, como classificação, filogenia, ecologia e possíveis aplicações. Estas características permitem afirmar que as coleções de culturas microbianas constituem-se, então, em registros permanentes da microbiota. Além disso, podem desempenhar papel fundamental em educação ambiental, por meio de exposições semelhantes a jardins botânicos, por exemplo, promovendo a divulgação, o conhecimento desses organismos a todos os cidadãos e mostrando sua importância (CGEE, 2009; KRIEGER et al., 2009; MELLO et al., 2003).

No Brasil, a coleção mais antiga remonta aos anos de 1825 a 1828, resultado das coletas do pesquisador W. J. Burchell. O primeiro trabalho contínuo e sistemático sobre nossos fungos foi realizado pelo padre austríaco J. Rick, considerado o pai da micologia brasileira. Como mencionado, estes e todos os outros manuscritos e herbários, frutos destas pesquisas pioneiras, encontram-se hoje depositados em coleções do exterior, permanecendo poucos registros no Brasil (CAPELARI; GUGLIOTTA, 1996; FIDALGO, 1962, 1968).

Em 1954, o Professor Augusto Chaves Batista iniciou uma série de trabalhos sobre taxonomia de fungos no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, em Recife, onde organizou uma coleção de fungos existente até os dias de hoje. Outra importante coleção de fungos foi desenvolvida pelo Professor Jaime Rocha de Almeida no antigo Instituto Zimotécnico, atual Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ – USP). Essa coleção compreende, principalmente, leveduras de interesse industrial. Há ainda outras coleções de fungos pelo Brasil, cada uma delas dedicada a um grupo específico, como indicado na tabela 1.

**Tabela 1:** Principais coleções brasileiras de culturas de fungos

<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Localização</b>	<b>Área de concentração</b>
Universidade de Brasília	UnB	Brasília	Fungos isolados de plantas do cerrado
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo	IPT	São Paulo	Fungos de interesse industrial
Departamento de Genética da ESALQ/USP	ESALQ/USP	Piracicaba	Fungos endofíticos e de interesse genético
Instituto Agrônomo de Campinas	IAC	Campinas	Fitopatógenos
Instituto de Botânica de São Paulo	IBT	São Paulo	Coleção de basidiomicetos
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e de Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Brasília	CENARGEN	Brasília	Fungos para o controle biológico de insetos
Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas	CBMAI – CPQBA/UNICAMP	Campinas	Fungos de interesse ambiental e industrial
Coleção de Culturas e Células da Universidade Federal de Minas Gerais	Coleção de Culturas e Células da UFMG	Belo Horizonte	Leveduras de interesse ambiental e industrial
Coleção de Culturas Tropical da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello	CCT – FTPT	Campinas	Micro-organismos não patogênicos ao homem, de interesse científico, industrial e ambiental

No entanto, a maioria dessas coleções é destinada à pesquisa e armazenam estirpes utilizadas somente em estudos científicos. Uma desvantagem das coleções de pesquisa refere-se ao fato de que quando o pesquisador responsável cessa o trabalho, muitas vezes a coleção também deixa de ser mantida, causando prejuízos financeiros e na preservação das espécies



(CGEE, 2009; KRIEGER et al., 2009). Esta realidade é lamentável, pois as coleções conferem maior credibilidade e confiabilidade ao trabalho realizado já que o depósito de uma estirpe requer o cumprimento de exigências de padronização mundial, a fim de garantir o controle da qualidade da mesma (MELLO et al., 2003; WFCC, 1999).

Em diversos países, além das coleções de pesquisa, existem as de iniciativas independentes ou mesmo governamentais, como a American Type Culture Collection (ATCC) e o United States Department of Agriculture Culture Collections (USDA), ambas nos Estados Unidos (EUA). Destacam-se ainda o Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) na Holanda (no momento o principal centro europeu de estudos de fungos), o German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ) na Alemanha, a Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM) na Bélgica, o National Collection of Yeast Cultures (NCYC) e o Commonwealth Agricultural Bureau International (CABI) no Reino Unido. Há também a Japan Collection of Microorganisms (JCM) no Japão (CGEE, 2009; MELLO et al., 2003). No Museu de História Natural em Paris, no Biology Center of the Museum of Upper na Áustria e no Smithsonian Institution nos EUA, há coleções de lâminas de espécies-tipo mantidas em museus e laboratórios (CGEE, 2009).

Um levantamento realizado pela Embrapa em 2003 constatou 52 coleções brasileiras de micro-organismos, sendo que algumas abrigam também organismos geneticamente modificados (MELLO et al., 2003). Cerca de 70 mil espécies estão depositadas nas coleções de culturas espalhadas pelo mundo (CGEE, 2009), representando apenas 11.500 das espécies descritas, ou seja, menos de 1% do total de espécies estimado (MACHADO, 2006). Acredita-se que muitas espécies possam estar representadas por menos de cinco estirpes nas coleções, indicando que há baixa variabilidade genética intra-específica preservada. No entanto, ainda não há um parâmetro que defina quantas estirpes devam ser conservadas para representar apropriadamente a variabilidade de um táxon (HAWKSWORTH, 2001).

São raras as coleções que possuem suas bases de dados informatizadas; iniciativas estão sendo tomadas para a criação de redes eletrônicas e bases de dados *online*, de modo a facilitar o acesso dessas informações aos taxonomistas, sistematas, demais pesquisadores e também ao cidadão comum, segundo um consenso mundial (COLWELL, 1997). Esta tendência estimula o desenvolvimento e a estruturação de bancos de dados e de imagens virtuais com acessos gratuitos sobre as mais diversas áreas. No caso dos fungos, onde a morfologia ainda é fundamental para identificação de gêneros e espécies, sabe-se o quanto uma boa imagem pode permitir a identificação e a caracterização dos mesmos. A fotodocumentação serve como ferramenta complementar para a identificação das espécies. Em

1991, Hawksworth já mencionava a importância da informatização dos dados descritivos e comparativos sobre fungos, incluindo suas ilustrações.

Nesse sentido, agências de fomento têm estimulado a informatização de acervos e a criação de redes de dados, como vem sendo feito pela FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos – do Ministério de Ciência e Tecnologia, sob coordenação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Este projeto visa o desenvolvimento de uma rede de coleções de micro-organismos com a implantação de um sistema de informação eletrônico de recursos genéticos microbianos. Este sistema deve compreender informações sobre as características dos micro-organismos e sobre os acessos ao germoplasma microbiano, de maneira ágil e confiável, além da elaboração de catálogos *online* e impressos. Com estes recursos, será possível estabelecer um fluxo contínuo de informações e materiais de maneira integrada e facilitada, além de evitar a desnecessária e onerosa realização de trabalhos semelhantes, otimizando a produção técnica e acadêmica da área (MELLO et al., 2003).

Outra iniciativa semelhante é o Sistema de Informação Ambiental do Biota (Sinbiota) vinculado ao Programa Biota da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), cujo objetivo é integrar as informações obtidas pelos pesquisadores do programa sobre a biodiversidade do estado e relacioná-las a uma base cartográfica digital (CGEE, 2009). Na UNESP de Rio Claro foi desenvolvido um *site* denominado “O mundo das leveduras”, contendo informações gerais sobre estes micro-organismos e uma base de dados, com informações sobre as estirpes preservadas e imagens, objetivando a divulgação de informações de modo que estejam ao alcance da comunidade.

Alguns países têm desenvolvido *websites* que visam catalogar a biodiversidade microbiana e que permitam o acesso da população a essas informações, como no caso do “All Species Foundation” nos EUA que pretende catalogar todas as espécies vivas do planeta num prazo de 25 anos (ALL..., 2009), o “Species 2000”, também dos EUA, que visa organizar uma base de dados com todas as espécies vivas do mundo e que dê acesso aos estudos sobre biodiversidade (SPECIES..., 2009), assim como o Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (CGEE, 2009) e o Integrated Taxonomic Information System (ITIS, 2009) que integra informações taxonômicas sobre todos os organismos do mundo (também sendo desenvolvido nos EUA). Outro projeto, denominado “The International Barcode of Life” tem por objetivo utilizar sequências curtas de regiões específicas de DNA para facilitar a identificação de espécies (PHILLIPS, 2009).

Estudos de grande importância, voltados ao levantamento e caracterização de fungos de macro e microambientes no Brasil têm sido realizados (ROCHA; ZOTTARELI, 2002;

SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2001; SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006; SCHOENLEIN-CRUSIUS; GRANDI, 2003; SOUZA; AGUIAR, 2004; WELLBAUM et al., 1999). No entanto, muitos ambientes e regiões dos grandes biomas brasileiros permanecem inexplorados e constituem uma fonte de recursos genéticos imensurável. Investigações como a proposta neste trabalho devem ser cada vez mais estimuladas.

### **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Fotodocumentar e preservar os diferentes táxons identificados das amostras de água dos rios Atibaia e Jaguari, bem como do efluente industrial da região petroquímica de Paulínia, SP, mediante a elaboração de fichas catalográficas informativas. Verificar a predominância dos táxons e a relação com os pontos de coleta.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Meios de cultura utilizados para identificação dos fungos

#### 4.1.1. Ágar aveia (OA)

Aveia em flocos	30,0 g
Ágar	13,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A aveia em flocos foi fervida com água destilada por 1 hora, filtrada em gaze e a seguir, completou-se o volume para 1000 mL novamente. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### 4.1.2. Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)

$K_2HPO_4$	1,0 g
Czapek concentrado (vide item 4.3.3)	10 mL
Extrato de levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### 4.1.3. Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures<sup>®</sup>)

Ágar Extrato de Malte	61,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,5 e esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### 4.1.4. Ágar nutriente sintético (SNA)

$KH_2PO_4$	1,0 g
$KNO_3$	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glicose	0,2 g
Sacarose	0,2 g

Ágar	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Celulose como fonte de carbono na forma de fragmentos de papel de filtro

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos. Os fragmentos de papel de filtro foram autoclavados separadamente (sob as mesmas condições) e um deles foi colocado sobre o meio de cultura, no centro da placa, minutos antes de inocular o micro-organismo.

#### **4.2. Meios de cultura basais para provas bioquímicas (somente para leveduras)**

##### **4.2.1. Meio basal para assimilação de fonte de carbono (C)**

Yeast Nitrogen Base (YNB)	0,34 g
Ágar	1,00 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos. Este meio foi utilizado como base para a adição de diferentes substâncias como fontes de carbono. Cada substância foi esterilizada e adicionada conforme as instruções técnicas do produto. As substâncias adicionadas foram: glicose, galactose, L-sorbose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, D-manitol, D-glucitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, salicina, gluconato, DL-lactato, citrato, inositol, 2-ceto-D-gluconato, D-gluconato, xilitol, L-arabinitol.

##### **4.2.2. Meio basal para assimilação de fonte de nitrogênio (N)**

Yeast Carbon Base (YCB)	0,585 g
Ágar	1,00 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos. Este meio também foi utilizado como base para a adição de diferentes fontes de nitrogênio. Cada substância foi esterilizada conforme as instruções técnicas do produto. As substâncias adicionadas foram: nitrato, nitrito, cadaverina, creatinina, L-lisina, D-glicosamina, creatina, imidazol.

#### 4.2.3. Meio basal para teste de crescimento na presença de alcoóis

Yeast Nitrogen Base (YNB)	0,34 g
Glicose	0,25 g
Ágar	1,00 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos. Após inoculação das estirpes na placa contendo o meio, foram adicionados na tampa da placa aproximadamente 0,3 mL de metanol, etanol, acetato de etila, propano 1,2 diol e butano 2,3 diol em placas individuais e vedadas para evitar a evaporação para o ambiente.

#### 4.2.4. Meio basal para teste de resistência a ciclo-heximida

Yeast Nitrogen Base (YNB)	0,34 g
Glicose	0,25 g
Ágar	1,00 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

A ciclo-heximida foi adicionada em duas diferentes concentrações: 0,1% e 0,01%. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

#### 4.2.5. Teste de crescimento em meio *vitamin-free*

Meio <i>Vitamin-free</i> Difco®	0,835 g
Ágar	1,00 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

O meio foi esterilizado conforme as instruções técnicas do produto.

### 4.3. Reagentes e soluções

#### 4.3.1. Solução salina 0,85%

NaCl	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

#### 4.3.2. Solução de cloranfenicol

Cloranfenicol	1,0 g
Álcool 95°GL q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada por ultra-filtração em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro e mantida a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.3. Czapek concentrado

$\text{NaNO}_3$	30,0 g
KCl	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Mantém-se por tempo indeterminado, sem esterilizar. O precipitado de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  pode ser re-suspendido mediante agitação antes de ser utilizada.

#### 4.3.4. Solução de glicerol 15%

Glicerol	150 mL
Água destilada q.s.p.	850 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm.

#### 4.3.5. Solução de lise

Tris	50 mM
Ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA)	50 mM
NaCl	250 mM
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,3%, pH= 8,0

Esterilizou-se por filtração.

#### 4.3.6. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)

Tris	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA	8,3 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	600 mL

pH da solução entre 8,2 - 8,3 (ajuste realizado com NaOH 1,0 M, quando necessário).

Completo-se o volume para 1000 mL.



**4.3.7. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x**

TBE 10x (solução estoque)	100 mL
---------------------------	--------

Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	900 mL
--	--------

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

**4.3.8. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x**

TBE 10x (solução estoque)	50 mL
---------------------------	-------

Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	950 mL
--	--------

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

**4.3.9. Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão)**

Tris 1M	10 mL
---------	-------

EDTA 0,5M	2 mL
-----------	------

Ajustou-se para pH=8,0 e completou-se o volume para 1 L com água miliq. Autoclavou-se durante 20 minutos.

**4.3.10. Gel de agarose 1%**

Agarose	1,0 g
---------	-------

TBE 1x	100,0 mL
--------	----------

Pesou-se a agarose que foi adicionada a um Erlenmeyer de 250 mL, juntamente com TBE 1x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

**4.3.11. Gel de agarose 1,4%**

Agarose	1,4 g
---------	-------

TBE 0,5x	100,0 mL
----------	----------

A agarose foi pesada em um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se o TBE 0,5x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

**4.3.12. Marcador de massa molecular**

DNA Ladder 1 kb (Promega<sup>®</sup>)

#### 4.3.13. Primers

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (WHITE et al., 1990)

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990)

NL1 (5'-TGCTGGAGCCATGGATC-3') (VILELA et al., 2005)

NL4 (5'-TAGATACATGGCGCAGTC-3') (VILELA et al., 2005)

Os *primers* foram diluídos em tampão TE até a concentração de 10  $\mu$ mol, no caso de ITS1 e ITS4, e a 10  $\mu$ M no caso de NL1 e NL4 e mantidos a -20°C. ITS1 e ITS4 foram utilizados para fungos filamentosos, enquanto NL1 e NL4 foram utilizados para leveduras.

#### 4.3.14. Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer”

Azul de bromofenol	0,025 g
Sacarose	4,0 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	10 mL

A solução foi misturada e armazenada a 4 °C.

#### 4.3.15. Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969)

Ácido fênico fundido-fenol 1%	20 mL
Ácido lático	20 mL
Glicerina	40 mL
Azul de algodão	0,05 g

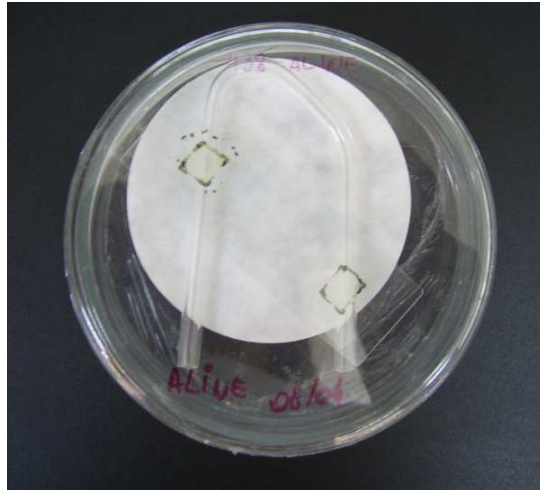
#### 4.4. Locais de coleta e isolamento de fungos

Os locais de coletas foram: ao longo do Rio Atibaia (pontos 4, 5 e 8), dentro da área da refinaria (pontos 2, 3 e 6) e no Rio Jaguari (ponto 1), no município de Paulínia, SP (conforme Fig. 2 do capítulo 1). As coletas ocorreram entre agosto de 2007 e março de 2009, totalizando 36 coletas em 7 pontos, num total de 252 amostras. Após a coleta, as amostras foram transportadas protegidas da luminosidade, sob refrigeração e armazenadas a  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  até o momento de serem processadas. As amostras foram plaqueadas de acordo com o método de Clesceri et al. (1998).

#### 4.5. Identificação e caracterização dos isolados

#### 4.5.1. Identificação por caracterização morfológica

As culturas foram observadas macro e microscopicamente mediante o uso de estereomicroscópio e preparação de lâminas para microscopia óptica, respectivamente, sendo as últimas em montagem úmida, com lactofenol azul de algodão. Quando necessário, utilizou-se o método de Riddell (ou técnica de microcultivo), em que um pequeno bloco de ágar inoculado foi colocado no centro de uma lâmina esterilizada, cobrindo-o com uma lamínula estéril. Este conjunto foi mantido no interior de uma câmara úmida, constituída de uma placa de Petri com um pedaço de papel de filtro umedecido em água destilada esterilizada, sobre um tubo de vidro em U, conforme a figura 1 (CROUS et al., 2009).



**Figura 1.** Microcultivo em lâmina do fungo do gênero *Trichoderma*.

A caracterização foi realizada baseando-se em chaves e manuais de identificação, de acordo com o grupo ao qual pertencesse o isolado, procedendo-se medição de estruturas, coloração, superfície de colônia, taxa de crescimento, e temperatura ótima de crescimento.

#### 4.5.2. Identificação molecular

Em alguns casos, a identificação por marcadores moleculares e sequenciamento do DNA ribossômico (rDNA) fez-se necessária. A extração de DNA foi adaptada de Sampaio et al. (2001) e Almeida (2005), por método mecânico, em que micro-esferas de vidro (Sigma<sup>®</sup>) estéreis foram adicionadas a microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de lise estéril. Foram adicionadas aproximadamente duas a três porções de micélio do fungo filamentosos com até 7 dias de crescimento, e no caso de leveduras, duas a três alçadas da colônia com no máximo 5 dias, e agitadas vigorosamente em vortex por 4 a 8 minutos, promovendo a quebra

das células para liberação do DNA contido no núcleo. Após a agitação, os tubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 65°C. Repetiu-se os procedimentos de agitação e de incubação no banho por mais 1 hora e, depois disso, os tubos foram postos em centrífuga por 15 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, recuperou-se a fase aquosa (aproximadamente 400 µL) em novos tubos estéreis previamente marcados. Para conferir a qualidade da extração, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TBE 1x, no qual 2 µL de cada amostra obtida do DNA bruto foram misturados com 2 µL de corante (Loading Buffer) e aplicados individualmente. Depois da corrida, o gel foi revelado em brometo de etídio, visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave<sup>TM</sup> Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID<sup>®</sup>.

As extrações bem sucedidas foram diluídas na proporção de 1 µL de amostra para 750 µL de água ultrapura estéril, qualidade Milliq<sup>®</sup> antes de cada reação. No caso das leveduras, foi realizado o procedimento de PCR para microssatélite (MSP-PCR), adaptado de Meyer et al. (1993), no qual foram comparados padrões de bandas para realização de agrupamentos entre as estirpes, bem como para detecção de diferenciações intra-específicas. Os padrões de bandas foram comparados com marcador molecular (Ladder), que possui 1000 pares de bases com pesos conhecidos (Promega<sup>®</sup> Corp.), aplicando-se 5µl nos poços das extremidades do gel. Para a amplificação por MSP-PCR, foi preparado um mix de reagentes contendo o *primer* (GTG)<sub>5</sub>, conforme tabela 2.

**Tabela 2.** Reagentes para o MIX de PCR para microssatélite

Reagentes	Quantidade por amostra
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
Primer (GTG) <sub>5</sub> – (10 µM)	2,0 µL
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	10,3 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

O mix foi agitado vigorosamente em vortex e posto em centrífuga por alguns segundos, distribuído em alíquotas de 20 µL em microtubos de 0,2 mL e por fim, adicionado 5 µL do DNA diluído. Essas misturas de reagentes com DNA foram agitadas brevemente em vortex e logo em seguida centrifugadas por alguns segundos. A partir de então, os microtubos das amostras foram colocados em um termociclador para dar início ao programa “MSP-PCR” (1º ciclo: 95°C/ 3 min, 40 ciclos a 93°C/ 45 s, 50°C/ 1 min, 72°/ 1 min e final de 72°C/ 6 min, 10°C ∞). Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,4%

preparado com TBE 0,5x), em tampão TBE 0,5x para verificar a qualidade dos produtos formados. Depois da corrida, o gel foi revelado em brometo de etídio, visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave<sup>TM</sup> Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID<sup>®</sup>. Quando identificada a semelhança entre as estirpes, uma foi selecionada para seguir as etapas subsequentes de sequenciamento.

Após a extração e, no caso das leveduras, após a corrida do microssatélite, foi feita a amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S. No caso de fungos filamentosos, foi realizada a amplificação da região ITS do DNA ribossômico 26S. Para isso, um mix de reagentes contendo os *primers* NL1 e NL4 foi preparado para amplificação do DNA das leveduras (Tab. 3) e outro para os fungos filamentosos contendo os *primers* ITS1 e ITS4 (Tab. 4).

**Tabela 3.** Reagentes para o MIX de PCR para amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S

Reagentes	Quantidade por amostra
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	8,3 µL
<i>Primer</i> NL1 (10 µM)	2,0 µL
<i>Primer</i> NL4 (10 µM)	2,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

**Tabela 4.** Reagentes para o MIX de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossômico 26S

Reagentes	Quantidade por amostra
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	8,3 µL
<i>Primer</i> ITS1 (µmol)	2,0 µL
<i>Primer</i> ITS4 (µmol)	2,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

Assim como no microssatélite, o mix foi distribuído em alíquotas de 20 µL em tubos de 0,2 mL e, em cada tubo, foram adicionados 5 µL de sua respectiva amostra de DNA diluído em água ultrapura, qualidade Milliq<sup>®</sup> estéril na proporção de 1:750. Os tubos foram agitados em vortex por 5 segundos, aproximadamente, seguido de breve centrifugação para serem distribuídos no termociclador e iniciar o programa de amplificação (1 ciclo de 96°C/ 3

min seguido de 35 ciclos a 96°C/ 30 s, 61°C/ 45 s, 72°C/ 1 min, 10°C/ ∞, para amplificação da região D1/D2 e 1 ciclo de 94°C/ 3 min seguido de 35 ciclos a 94°C/ 1 min, 52°C/ 1 min, 72°C/ 2 min, 10°C/ ∞, para amplificação da região ITS). Para verificação dos produtos de amplificação, 2 µL das amostras foram misturadas com corante (Loading Buffer) e aplicadas em gel de agarose 1% para eletroforese, como realizado para verificação da extração.

Depois da verificação da qualidade dos produtos formados na amplificação, as amostras foram purificadas, utilizando-se o kit “Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit”, da GE Healthcare<sup>®</sup>. Subsequentemente, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% para eletroforese para nova checagem.

As amostras purificadas seguiram para o passo da reação de sequenciamento, utilizando-se o kit “DYEnamic<sup>™</sup> ET Dye Terminator Kit”, da GE Healthcare<sup>®</sup>. Apenas 1 µL das amostras foi utilizado para a reação de sequenciamento. Foi empregado o programa “DYEnamic” (25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/ 15 s e 60°C/ 60 s). Após a amplificação, todas as amostras seguiram para a purificação da reação de sequenciamento, adaptado do manual de instruções do kit “DYEnamic<sup>™</sup> ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare<sup>®</sup>. A seguir, após secagem, os *pellets* das amostras foram re-suspendidos com 3 µL de formamida (do kit do DYEnamic<sup>®</sup>), agitadas em vortex e centrifugadas por alguns segundos, colocadas no gelo e abrigadas da luz até serem aplicadas no sequenciador ABI 377 (Applied Biosystems).

Após esse procedimento, as sequências obtidas foram editadas mediante uso do *software* BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.9.0. Depois da edição, foram analisadas no site < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> > e comparadas com as depositadas no banco.

#### **4.6. Preservação das culturas**

As estirpes isoladas neste estudo foram preservadas em ágar malte 2% inclinado em tubos de cultura e em *ultrafreezer* mediante a técnica de criopreservação a -80°C (CBS, 2009) com algumas adaptações. Nesta, microtubos de polipropileno de 2 mL e pérolas de vidro (3 mm diâmetro) foram esterilizados em autoclave, a 1 atm, a 121°C, por 15 minutos. Em seguida foram etiquetados em duplicata, sendo dois microtubos para cada estirpe a ser preservada. Em cada microtubo, foram adicionados 400 µL de solução estéril de glicerol 15%. As estirpes a serem estocadas foram cultivadas previamente por 3 a 5 dias, no caso de leveduras, e 7 dias, no caso de fungos filamentosos, em ágar malte 2%. Após a adição da solução de glicerol, as estirpes foram transferidas aos microtubos, agitadas vigorosamente em vortex por 10 segundos, aproximadamente, e, logo após, foram adicionadas as pérolas de

vidro até cobrir todo o volume de glicerol. Em seguida, os microtubos foram congelados por 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de serem transferidos para os *ultrafreezers* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As duplicatas foram guardadas em caixas e *freezers* separados, para garantir uma cópia de segurança para cada estirpe (Fig. 2).



**Figura 2.** Caixa para preservação de micro-organismos em crio-tubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

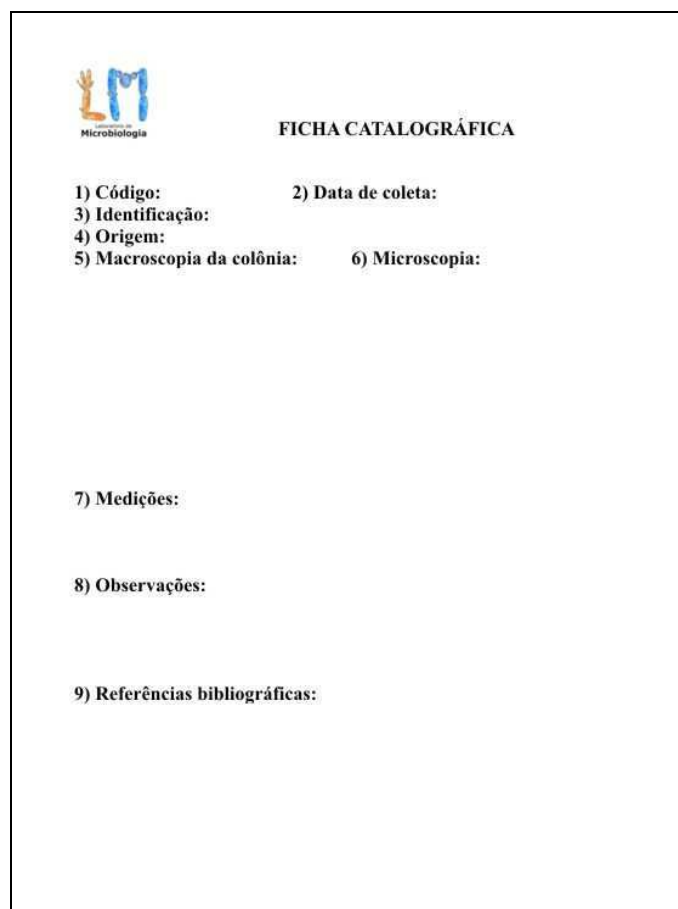
#### 4.7. Documentação dos fungos

As espécies de fungos isoladas foram foto-documentadas através de um microscópio óptico com um captador de imagens, Leica<sup>®</sup> DM 1000, e uma câmera Leica<sup>®</sup> DFC 280 acoplada.

As imagens obtidas, juntamente com as suas respectivas descrições e observações, foram reunidas em uma ficha catalográfica para cada táxon identificado. Na ficha constam as seguintes informações: código do isolado, data de coleta, identificação, origem, imagem de macroscopia de colônia, imagem de microscopia, medições, informações taxonômicas, descrições macro e microscópicas, informações sobre estirpes de mesma espécie quando ocorrerem, observações relevantes, sequencia de DNA (quando obtida) e referências bibliográficas utilizadas para identificação morfológica mediante uso de chaves.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 314 culturas de fungos, das quais 51 não sobreviveram sob condições laboratoriais, 63 mantiveram-se estéreis (fungos não esporulantes - FNE) e 33 ainda encontram-se em fase de identificação. Os 167 isolados viáveis identificados distribuíram-se em 57 táxons dos quais 47 espécies foram registradas a partir de 38 gêneros. Os resultados até o momento obtidos foram fotodocumentados nas fichas catalográficas de modelo padrão para a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do CEIS. Na figura 3 encontra-se um modelo da ficha e em sequência a fotodocumentação dos gêneros encontrados, representados por uma das espécies identificadas. O critério de apresentação das fichas seguiu a sugestão de Crous et al. (2009) e por ordem alfabética. A discussão seguiu o mesmo critério. O código de identificação das culturas **ASC** significa Aline da Silva Cruz, e o número expressa a sequência do isolamento.



The image shows a template for a catalog card. At the top left is a logo with a stylized 'M' and the word 'Microbiologia' below it. To the right of the logo is the title 'FICHA CATALOGRÁFICA'. Below the title are nine numbered fields for data entry:

- 1) Código:
- 2) Data de coleta:
- 3) Identificação:
- 4) Origem:
- 5) Macroscopia da colônia:
- 6) Microscopia:
- 7) Medições:
- 8) Observações:
- 9) Referências bibliográficas:

**Figura 3:** Modelo proposto de ficha catalográfica.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC449

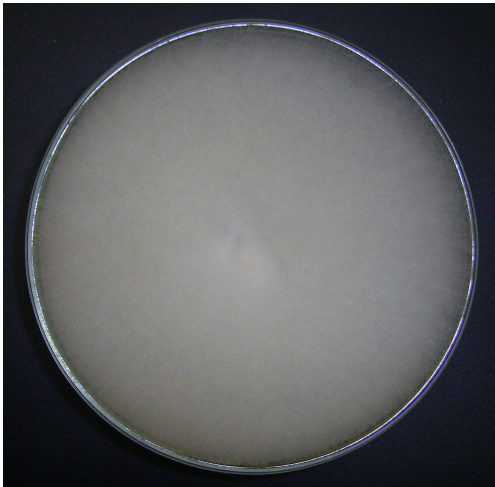
2) **Data de coleta:** 10/03/2009

3) **Identificação:** *Mucor* sp. Mich. ex St.-Am.

4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa - 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: colônia de 30 dias de incubação a 25°C.



Esporângio contendo esporangiósporos em seu interior.

7) **Medições:**

Esporângios: 1-2  $\mu\text{m}$  x 4-7  $\mu\text{m}$

Esporangióporos: 23-30  $\mu\text{m}$  de diâmetro

8) **Observações:**

Em fase de identificação específica.

9) **Referência bibliográfica:**

BONONI, V.L.R. (org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos:** noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998. 184p.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC183

2) **Data de coleta:** 17/02/2008

3) **Identificação:** *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice

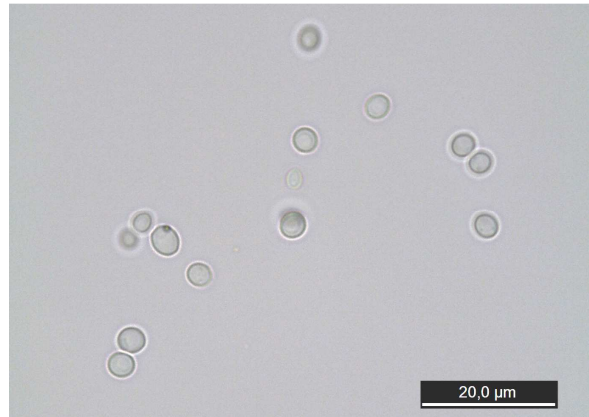
4) **Origem:** Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células com 7 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Células: 2,0-3,5 x 3,0-4,5 µm

8) **Observações:**

R – região D1/D2:

AGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATC  
TTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCAGACCT  
ATGTAAAGTTCCTTCCAAGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATGG  
CGAGAGACCGATAGCGAAACAAGTACAGTGTATGGAAAGATGAAAAGAAGTTTGAAGAAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTG  
TTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTGTATGTTACTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGC  
ATCAGTTTGAGCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGATTCGGTAGTGTGTATAGTCTTTGTGCGATACTCCAGCTT  
AGACTGAGAGGCGCTTCG

Testes de assimilação:

**Positivo:** glicose, galactose, L-sorbose, sacarose, maltose, trealose, melezitose, D-xilose, N-acetil D-glicosamina, etanol, glicerol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, α-Metil D-glicosídeo, gluconato, imidazole, cadaverina, L-lisina, *vitamin-free*, D-glucono-lactona.

**Fraco:** rafinose, citrato, 2-ceto-D-gluconato, nitrato, creatinina, D-glicosamina (fonte N), acetato de etila.

**Negativo:** celobiose, lactose, melibiose, inulina, amido solúvel, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-glicosamina, metanol, eritritol, galactiol, salicina, DL-lactato, inositol, creatina, D-gluconato, xilitol, L-arabinitol, propano 1,2 diol, butano 1,2 diol, nitrito, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%.

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC187	17/02/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)
ASC188	28/04/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)
ASC200	28/04/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)
ASC242	28/04/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)
ASC317	28/10/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)
ASC318	28/10/2008	Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)

9) **Referência bibliográfica:**

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 1139p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC387

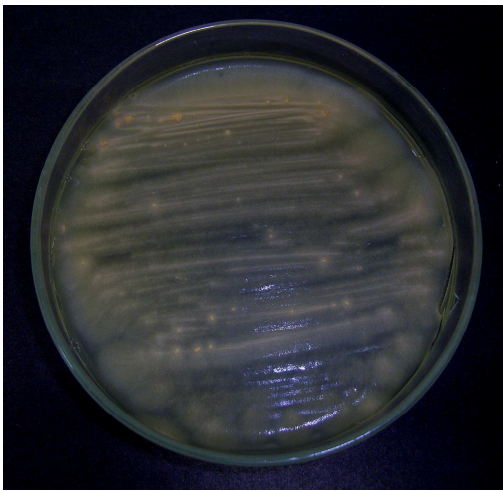
2) **Data de coleta:** 15/12/2008

3) **Identificação:** *Coniochaeta pulveraceae* (Ehrh.) Munk

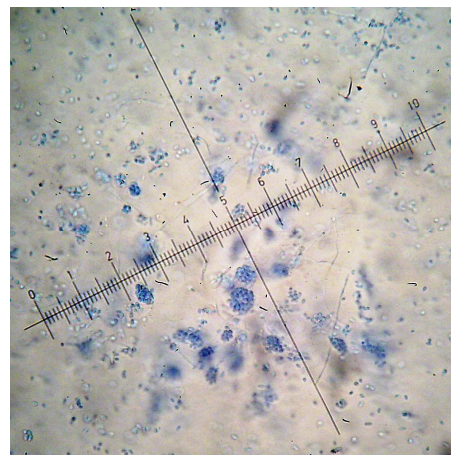
4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Conídios e micélio verdadeiro.

7) **Medições:**

Conídios: 3.0-3.5 x 1.5-2.5 µm.

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2

```
CGAGTGAAGCGGCCACAGCTCATATTTGAAATCTGGCCTCGGCCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGAT
GCTTTGGGTGCGGTGCCTTCTGAGTTCCTGGAACGGGACGCCGAGTAGGGTGAGAGCCCCGTA
CAGTTGGACACCAAGCCCTTGTAAGCTCCTTTCGACGAGTCGAGTACTTTGGGAATGCTGCTCTAA
ATGGGAGGTATATCTCTTCTAAAGCTAAATATAGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGA
TCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAACGG
CTTGCGACCAGACTTGCGCCGGGACGATCATCCGCGTCTCCGCGGTGCACTCGCCCCGGCGCAG
GCCAGCGTCGGTTCTAGCGGGGGACAAAAGCTTGGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAGTGTTATAG
CCCCTCGCCGAATGCCCCCGCCGGACGAGTCTGCGCTCCGGCAAGGACGCTGGCGTAATGGTCGCC
AGCCACCCGTCTTGAA
```

9) **Referência bibliográfica:**

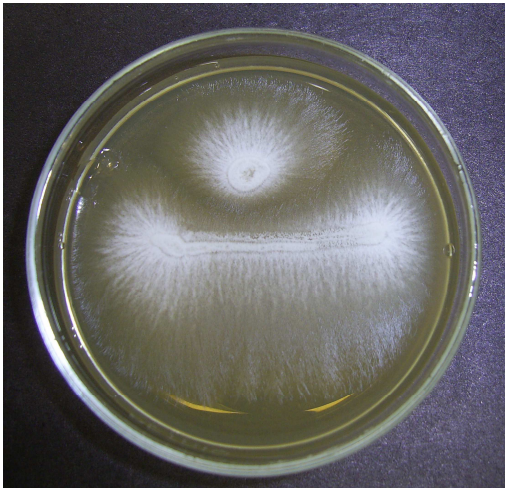
MUNK, A. *Coniochaeta pulveracea*. **Dan. bot. Arkiv.** Kobenhavn, v.12, n. 11, p. 9, 1948.



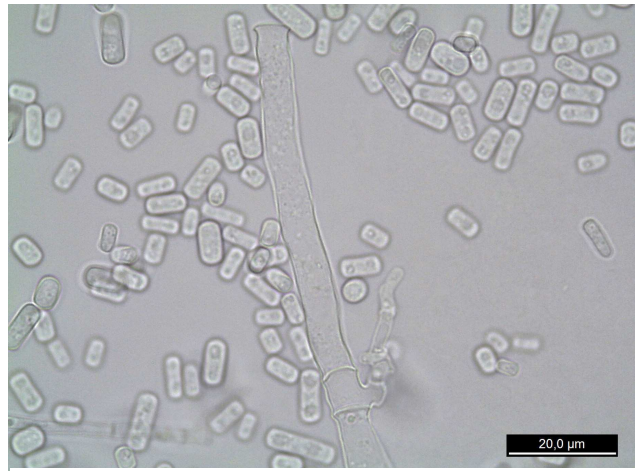


## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC360
- 2) **Data de coleta:** 27/11/2008
- 3) **Identificação:** *Galactomyces reessii* (Van der Walt) Redhead & Malloch
- 4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)
- 5) **Macroscopia da colônia:**
- 6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Artrosporos e hifa (fase assexuada).

### 7) Medições:

Artrosporos: 6-7 x 5-6 μm

### 8) Observações:

Consenso – região D1/D2

```
TCGAGTTGTAATTTGTAGATTGTATCTTGAGAGCGGACTAAAGTCTGTTGGAATACAGCCCCTTAG
AGGGTGACAGCCCCGTAAGTTTATTCTCATTGTAAGATGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGA
ATGCAGCTCTAAGTGGGAGGTAAATTCCTTCTAAAGCTAAATATTGACGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTA
AAAGGGAAGGGTATTGAATCAGACATGGTGTCTGTTGTTTCAGCTTTGCTTCGGCATGGTGTATTCA
ACAGCACTGGGCCAAGGTGGGGTGATTGGGAGTGAAAAGGAATAGGAATGTGGCTCTTCGGAGT
GTGATAACCTGTTTTCATAACTCCTCAGTCGCCTCAGGACTGCGCTTCGGCAAGGACTTTGGC
```

### 9) Referência bibliográfica:

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC205

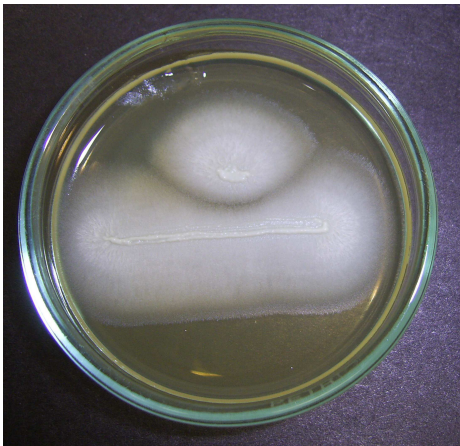
2) **Data de coleta:** 13/08/2008

3) **Identificação:** *Hyphopichia burtonii* Boidin et al.

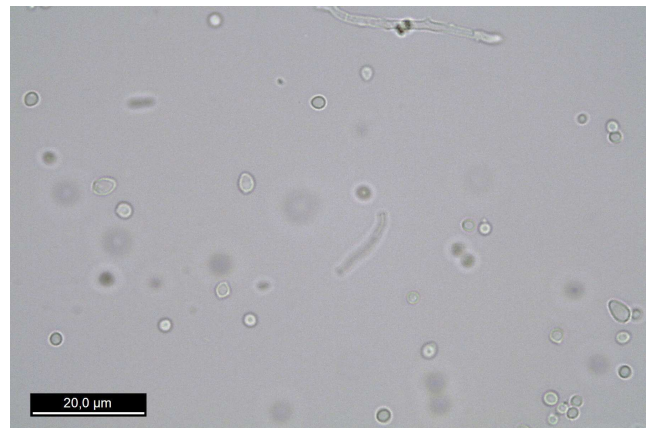
4) **Origem:** Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m - 22° 44' 25,3" (WO) 47° 07' 35,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células e fragmentos de pseudo-hifas.

7) **Medições:**

Células: 2-3 x 1,5-2μm

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2

```
TTCATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAA
GCTCATATTTGGAATCTCAGTCTTTCAGGCTGCGAGTTGTAATTTGAAGACGTATTTGAAGTAAGC
ACATGTGCGAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGTGTTCACTGC
TTCATGTAAAATGCAGTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
CATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAAGATGAAAAG
AACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTC
GGGCAACCGGGCCAGCATGGGGTGGGGGAGTAGGATAACCCTGCCAGGAAAGTGGCTTCGCTTCG
GTGGAGTGTATAGCCTGTAGCTATACTGCTACCCTCGCCCGAGGACTGCGGAAACAAGGATGCTG
GCATAATGATCTTAAGCCGCCCGTCTTGAAC
```

9) **Referências bibliográficas:**

ARX, J.A.; VAN DER WALT, J. P. The ascigerous state of *Candida chodatii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 1976, n. 42, v. 3, p. 309-314.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC220

2) **Data de coleta:** 16/07/2008

3) **Identificação:** *Kazachstania exigua* (Reess ex Hansen)

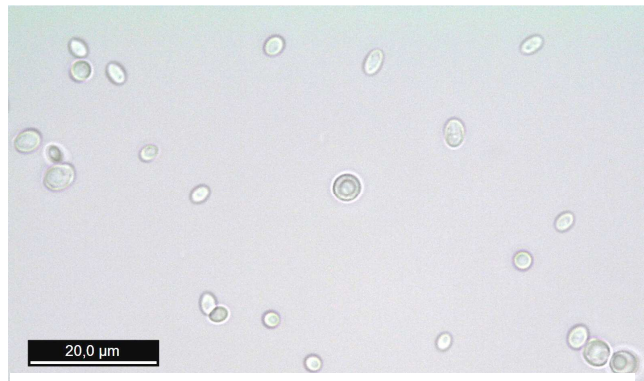
4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células de 7 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Células: 4,6 – 6,9 × 3,4 – 5,7 µm

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2

```
AGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTA
ATTTGTAGAGGGCGACTTTGGGGCGGCTCCTTGTCTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGG
TGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGGCGTTCCGTGTAAAGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG
ACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATT
GTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCGCTCCTTGTGGGTGGGGGA
ATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGTCGGATAAAACCAGGGGAACGTAGCTTGC
TTCGGGAAGTATTATAGCCTCTGGAATACGGCCAGCCGGGACTGAGGAACGCGATTTCGTCAAGG
ATGCTGGCATAATGGTTATAT
```

9) **Referência bibliográfica:**

LIU et al. New records of *Kazachstania* species in Taiwan. **Taiwania**, Taipei, n. 53, v. 3, p. 293-300, 2008.



## FICHA CATALOGRÁFICA

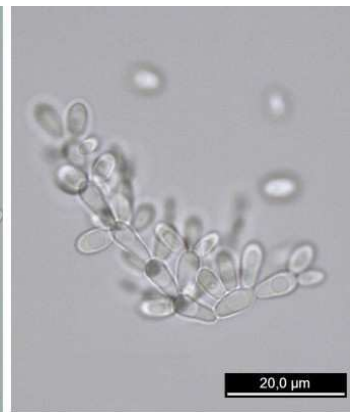
- 1) **Código:** ASC223  
 2) **Data de coleta:** 16/07/2008  
 3) **Identificação:** *Pichia jadinii* (Sartory et al.) Kurtzman  
 4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**  
 6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células e brotamento.



Pseudomicélio.

### 7) Medições:

Em andamento.

### 8) Observações:

Consenso – região D1/D2

```
CTCAAATTTGAAATCTGAGGCTCTCCAGCCCCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTGTCTGGTGCCGG
CGCCCTGTCTACGTTCTTGGAAACAGGACATCGCAGAGGGTGAGAATCCCCTGTGGCGGGGCGGCC
TGGCTCCGTGTAGAGCGCCATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
ATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
AAAGAACCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGGATCAG
ACTTGGTGCTGTGCGAATAGCGGCTCTTCTGGGCCGCCCACTCGCACTCCACCGGGCCAGCATC
GGTTTGGGCGGCAAGACAATGGCGGGGGAACGTGGCACTGCTCTCGGGCAGTGTGTTTATAGCCCT
CGCTGATGTTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGGCTTCTGCCTAGGATGCT
```

Testes de assimilação

**Positivo:** maltose, celobiose, trealose, lactose, D-xilose, etanol, glicerol, nitrato, nitrito, cadaverina, L-lisina, D-glucono-lactona.

**Fraco:** galactose, N-acetil D-glicosamina, gluconato, DL-lactato, imidazole, xilitol, L-lisina

**Negativo:** L-sorbose, inulina, amido solúvel, D-arabinose, D-ribose, D-glicosamina, eritritol, ribitol, galactitol, D-manitol, D-glucitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, inositol, 2-ceto-D-gluconato, D-glucoronato, L-arabinitol, propano 1,2 diol, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%, acetato de etila.

### 9) Referência bibliográfica:

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.



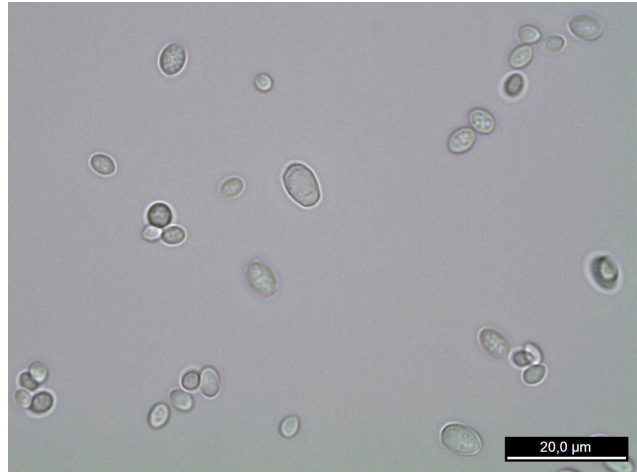


## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC193  
 2) **Data de coleta:** 29/05/2008  
 3) **Identificação:** *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen  
 4) **Origem:** Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente - 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**  
 6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células com 7 dias de incubação a 25°C.

### 7) Medições:

Células: 3,0-10,0 x 4,5-21,0 µm

### 8) Observações:

Consenso – região D1/D2:

```
GCTCAAATTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTGCTATGTTCC
TTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGC GGTTCTTTGTAAAGTGCC TTCGAAGAGTCGAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACA
GTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGCATTGATCAGA
CATGGTGTGTTGTGCCCTCTGCTCCTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGCCAGGATAA
ATCCATAGGAATGTAGCTTGCCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG
TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATG
```

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC174	02/04/2008	Ponto 4 – 200 m a montante no Rio Atibaia - 22° 44' 43,0" (WO) 47° 07' 25,3" (S) – 200 m
ASC405	14/01/2009	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

Testes de assimilação

**Positivo:** glicose, galactose, sacarose, etanol, ribitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, imidazole, *vitamin-free*.

**Fraco:** maltose, rafinose, gluconato, creatinina, D-glicosamina (fonte N), acetato de etila.

**Negativo:** celobiose, trealose, lactose, melibiose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, metanol, glicerol, eritritol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, salicina, DL-lactato, citrato, inositol, 2-ceto-D-gluconato, D-glucoronato, xilitol, L-arabinitol, propano 1,2 diol, butano 2,3 diol, nitrato, nitrito, cadaverina, L-lisina, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%, D-glucono-lactona.

### 9) Referência bibliográfica:

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC215

2) **Data de coleta:** 16/07/2008

3) **Identificação:** *Williopsis* sp. Zender

4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células com 7 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Células: 3-8 x 3-6,5μm

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2:

```
TTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTG
AAGATAGTTTTCTGGTGCTGGCCCCGTCTATGTTCCCTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCT
GGCGGGGTGGTCCAGTGCTTTGTAGATTTCTATCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTG
GTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGTGAAAGATGAAAA
GAACTTTGAAGAGAGAGTGAAGAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGGGTATTAGATCAGACTTGGTGT
TGTGATTATCTTCCCTTCTGGGTTGTGCACTCGCATTTCACTGGCCAGCATCGGTTTGGGTGGCAAGATAATG
GCTTGGGGAACGTGGCACTGTCTTCGGGCAGTGTGTTTATAGCCCCTGCTGATGTTGCTGCCTAGACCGAGGA
CTGCGGCTTCTGCTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAACA
```

Testes de assimilação:

**Positivo:** maltose, celobiose, trealose, glicerol, α-metil D-glicosídeo, gluconato, nitrato, nitrito.

**Fraco:** galactitol, DL-lactato, xilitol, cadaverina.

**Negativo:** galactose, L-sorbose, lactose, inulina, amido solúvel, D-xilose, D-arabinose, D-ribose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, etanol, eritritol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, inositol, imidazole, 2-ceto D-gluconato, D-glucoronato, L-arabinitol, propano 1,2 diol, L-lisina, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%, acetato de etila, D-glucono-lactona.

9) **Referência bibliográfica:**

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC278

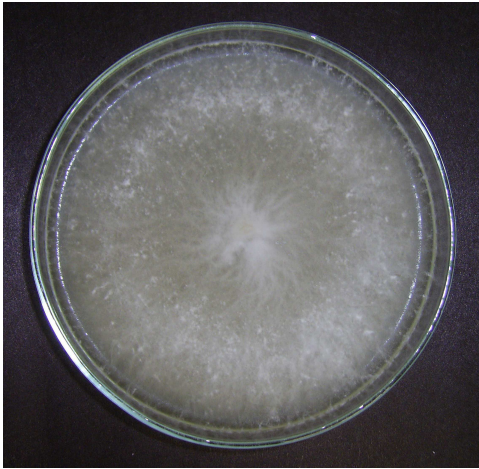
2) **Data de coleta:** 22/09/2008

3) **Identificação:** *Eutypella* sp. (Nitschke) Sacc.

4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa - 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia estéril.

Em MA2%: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Aguardando esporulação.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS

```
CCTAGTTGCCTCGGCGGATTGCCCTGGGACGACCTACCCTGCAGtGAGTTACCCTGTAACGAGTTGC
CCTGTAGAGACCTGCCCTGTAGCCTGCCCGCCGGCGGCCAACCTAAACTCTGTTTTATTGTGGCACT
TCTGAGGATTATTCTAAATGAATTAATAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCTAT
TTGCTTGGCGTTGGGAGACTTGTAGGCCCGGCCTGCAAGCTCCTGAAATAGATCGGCGGAGTCGTG
GCGACCTCAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTTAGGTGTGCGGCGCTGGCGTTTAGCCGTTAAACCCCC
TATTTTTTTAGTCTTGACCTCGGGATCAGGtAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC
```

9) **Referência bibliográfica:**

SACCARDO, P.A. *Atti Soc. Veneto-Trent. Sci. Nat.* Padova, v. 4, n. 80, 1875.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC210

2) **Data de coleta:** 16/07/2008

3) **Identificação:** *Exophiala dermatitidis* (Kano) de Hoog

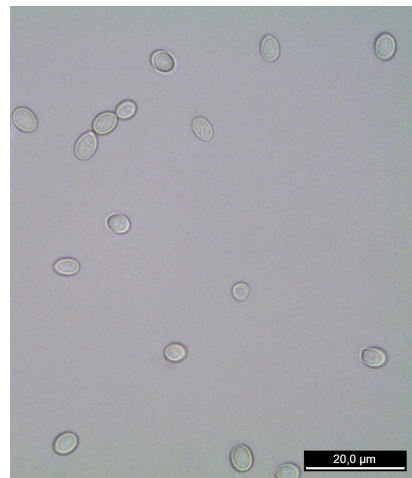
4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em PDA: cultura de 15 dias de incubação a 25°C.



Conídios.

7) **Medições:**

Células: 2,0-4,0 x 2,5-6,0 µm

8) **Observações:**

Consenso – região ITS:

```
ATCATTAACGAGTTAGGGTCTTCTCAGGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTTTACCCGACCCATGTTGCTTCGGCG
GGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCGGAGGACCGCCTATTCAGGTCTCTGGCCCGCGCCCGCCGGTAGCCAATTC
TACCAAACCTTGAATCAAATCGTGTCCAATGTCTGAGTATATTACAAAATAAAAAGCAAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTG
AGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTATCA
CCCCTCAAGCCCCCGCTTGGTGTGGACGGTCTGGTCGAGCGTTTCCGCGGACCCCTCCCAAAGACAATGA
CGCGGCCTGGTTGGACCCCGGTACACGGAGCTTCTCACTGAGCACGTATCGGTTTCAAGGTGTCCCCGGGA
CCCCGTGACCTCTTTGCTCCCCTGCGGGAGTGGGAGAGAACCCCTTTTATCAAGGTTGACC
```

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

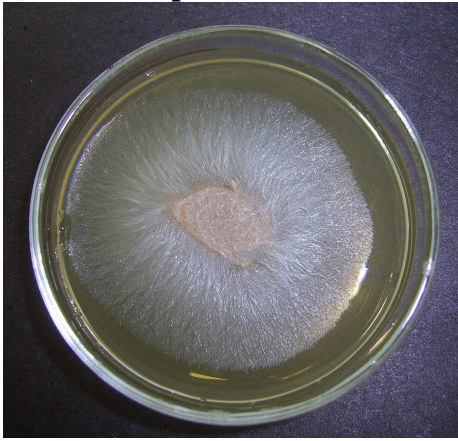
UIJTHOF, J.M.J. **Taxonomy and phylogeny of the human pathogenic black yeast genus *Exophiala* Carmichael**. Academic Proefschrift. Wageningen: Ponsen & Looijen. 1996. 120p.





## FICHA CATALOGRÁFICA

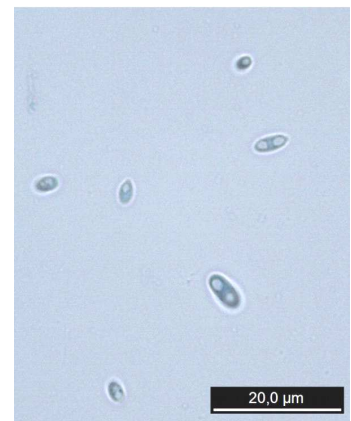
- 1) **Código:** ASC372  
 2) **Data de coleta:** 15/12/2008  
 3) **Identificação:** *Acremonium breve* (Sukapure & Thirum.) W. Gams  
 4) **Origem:** Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente - 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**  
 6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Micélio.



Conídios.

### 7) Medições:

Em andamento.

### 8) Observações:

Consenso – região D1/D2

TTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCTTCGGGTCCGAGTTGTAATTT  
 GCAGAGGATGCTTTTGACGAGGTGCCGACCGAGTGCCCCCTGGAACGGGCCCGCTAGAGGGTGAGAGCCCCGT  
 ATGGTCGCACTGCCGAGTCTCTGTAAAGCTCCTTCAACGAGTCGAGTAGTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGA  
 GGTGTATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGTGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGGTGAAAA  
 GAACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTCAAAGGGGAAGCATTATGACCAGACTTGGGCGTG  
 GTTGATCATCCGGCGTTCTCGCCGGTGCACTCGCCCGCCTAGGCCAGCATCAGTTTCGCCTCGGGGGATAAAGG  
 TTTCGGGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCCC

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC255	10/09/2008	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)
ASC349	27/11/2008	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)
ASC404	14/01/2009	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

### 9) Referência bibliográfica:

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC343

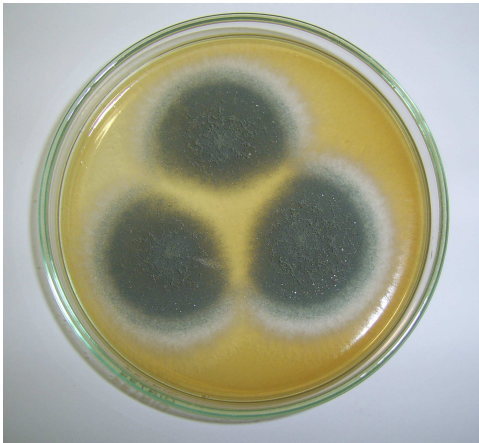
2) **Data de coleta:** 12/11/2008

3) **Identificação:** *Aspergillus fumigatus* Fres.

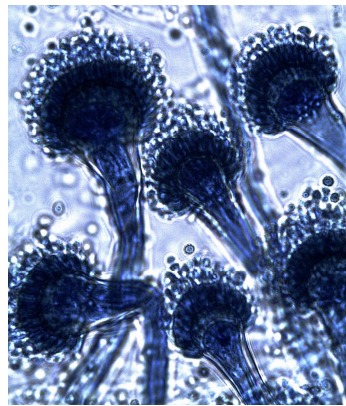
4) **Origem:** Ponto 4 – 200 m a montante no Rio Atibaia - 22° 44' 43,0" (WO) 47° 07' 25,3" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em CYA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.



Conidióforos. Objetiva: 100x.



Conídios. Objetiva: 100x.

7) **Medições:**

- diâmetro de colônia: 5,8 – 6,6 cm

- conídios: 2,82 – 3,39 µm de diâmetro

8) **Observações:**

Em CYA:

- Micélio branco;
- Conídios verde-azulados;
- Exsudatos transparentes;
- Superfície não-sulcada;
- Reverso branco, centro bege.

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC402a	14/01/2009	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)
ASC456	10/03/2009	Ponto 6 – efluente industrial bruto 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1988. 116p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC431

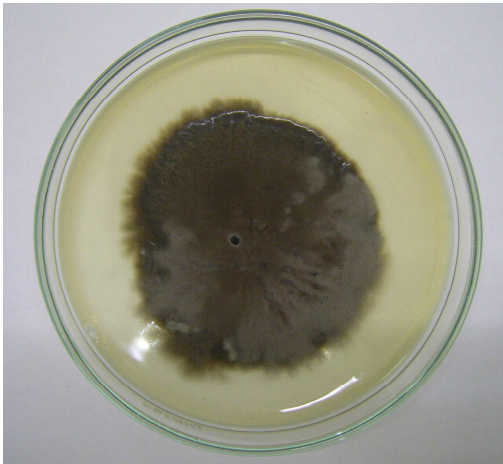
2) **Data de coleta:** 15/08/2007

3) **Identificação:** *Cladosporium cladosporioides* (Fresenius) de Vries

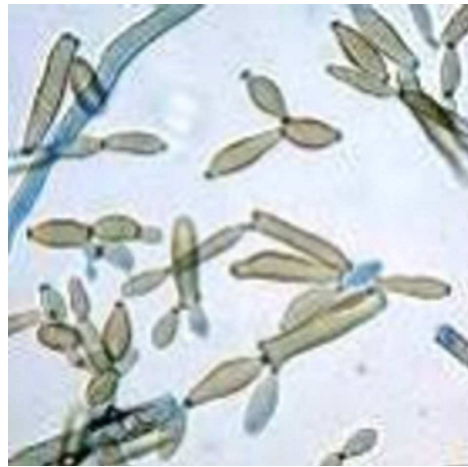
4) **Origem:** Ponto 4 – 200 m a montante no Rio Atibaia - 22° 44' 43,0" (WO) 47° 07' 25,3" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 45 dias de incubação a 25°C.



Ramoconídios. Objetiva: 40x.

7) **Medições:**

Conídios: 2-5 x 2-6 µm

Conidióforos: 118-180 x 2-5 µm

8) **Observações:**

Sequenciamento em andamento.

9) **Referência bibliográfica:**

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Stud. Mycol.** Utrecht, v. 58, 2007, 253p.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

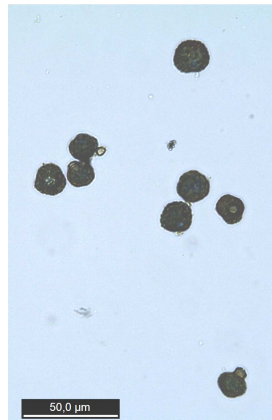


## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC260  
 2) **Data de coleta:** 10/09/2008  
 3) **Identificação:** *Epicoccum nigrum* Link  
 4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa - 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**  
 6) **Microscopia:**



Em OA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.



Conídios.



Detalhe do conídio.

7) **Medições:**

Conídios: 15-25 µm de diâmetro

8) **Observações:**

Consenso – região ITS:

```
GAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGTAGTAC
CTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACATTCAAACCCTTTGAGTTGCAATCAGCGTCTGAA
AAACATAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAT
GGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTTGTCTCGCCTCTGCGT
GTAGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCA
TAACGGCGACGTCCAAAAGTACATTTTACTACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC
ATATCAAT
```

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC257	10/09/2008	Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)
ASC433	01/08/2007	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

GRAVESEN, S.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Microfungi**. 1 ed. Special-Trykkeriet Viborg, Denmark, 1994. 168p.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC341

2) **Data de coleta:** 12/11/2008

3) **Identificação:** *Fusarium cf. oxysporum*

4) **Origem:** Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente - 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: colônia de 30 dias de incubação a 25°C.



Micro e mesoconídios.

7) **Medições:**

Macroconídios: 23-54 x 3-4,5 µm

Microconídios: 5-12 x 2.3 - 3.5 µm

8) **Observações:**

Aguardando resultado do sequenciamento.

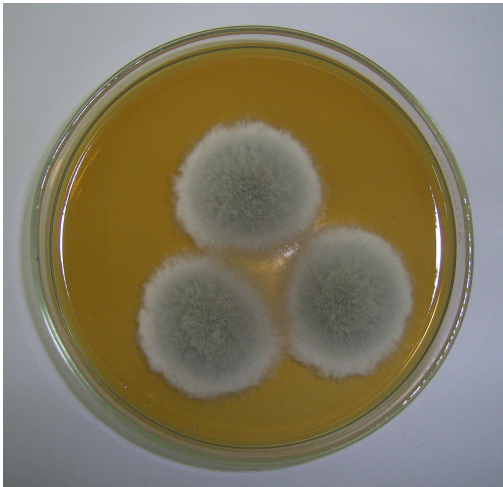
9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

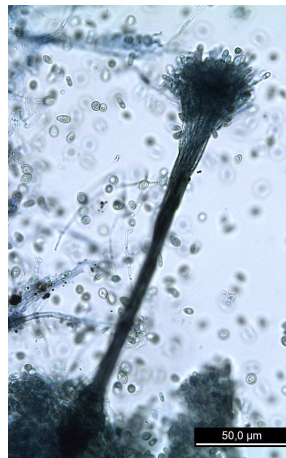


## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC163                      2) **Data de coleta:** 26/09/2008
- 3) **Identificação:** *Graphium* sp. Corda
- 4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)
- 5) **Macroscopia da colônia:**                      6) **Microscopia:**



Em CYA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.



Conidióforo.



Conídios.

- 7) **Medições:**  
Em andamento.

- 8) **Observações:**  
Aguardando resultado do sequenciamento.

- 9) **Referência bibliográfica:**

WINGFIELD, M.J.; KENDRICK, W.B.; VAN WYK, P.S. Analysis of conidium ontogeny in anamorphs of *Ophiostoma*: *Pesotum* and *Phialographium* are synonyms of *Graphium*. **Mycological Research**. Cambridge, n.95, p. 1328–1333, 1991.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC392

2) **Data de coleta:** 15/12/2008

3) **Identificação:** *Mariannaea camptospora* Samson

4) **Origem:** Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S).

5) **Macroscopia da colônia:**



Em PDA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Micélio e conídios.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS

```
AACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTGTTTTGTTGC
TTCGGCGGTGCCCTCGCTCTCGTGGCGAGGCCCGCCAGAGGACCCAAACAAACTCTTTGATTTTGA
TCTAGGATTTTACTTCTGAGTGATATACAAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA
ACCCTCAAGCTCCGGCTTGGTGTGGGGATCGGCAGCCCGGCTTCGCGCCGACGCCGTCCCCCAA
TGCAGTGGCGGTACGCTGTAGCTTCCTATGCGTAGTAGCACACCTCGCACTGGAGAGCAGCGCGG
CCACGCCGT
```

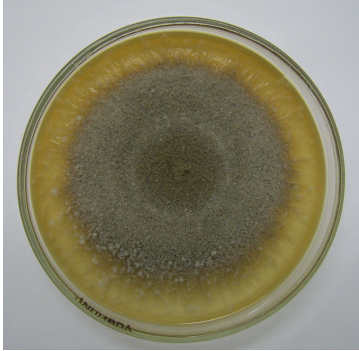
9) **Referência bibliográfica:**

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Stud. Mycol. Baarn**, n.6, p. 1-119, 1974.



## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC418  
 2) **Data de coleta:** 01/08/2007  
 3) **Identificação:** *Microsphaeropsis arundinis* (S. Ahmad) B. Sutton  
 4) **Origem:** Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m - 22° 44' 25,3" (WO) 47° 07' 35,2" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**



Em MA2%: colônia de 30 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**

Colônia estéril.

7) **Medições:**

Aguardando esporulação.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS:

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCAATTCAACGGTGTGGTTCGCGGCCTCCGGGGGCTCCCCCGGGCGGTAGAGGTAA  
 CACTCTTACGCGCCACATGTCTGAATCCTTTTTTACGAGCACCTTTCGTTCTCCTTCGGTGGGGCAACCTGCCGTTGGAACCT  
 ATCAAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTTCAGATACAAACAATCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTG  
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT  
 TGGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCTGTGCC  
 GCCTCTGCGCGTGGACTCGCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCAGAGGGGTG  
 TGGGCCGCTCCACGAAGCAACATTATCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAG  
 CGGGAGGA

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC172	02/04/2008	Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)
ASC179	17/02/2008	Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m 22° 44' 25,3" (WO) 47° 07' 35,2" (S)
ASC240	28/08/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)
ASC275	22/09/2008	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)
ASC295	22/09/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S).
ASC334	28/10/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)
ASC373	15/12/2008	Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)
ASC390	15/12/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)
ASC393	15/12/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)
ASC430	01/08/2007	Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)
ASC453	10/03/2009	Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m 22° 44' 25,3" (WO) 47° 07' 35,2" (S)
ASC459	10/03/2009	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata. Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

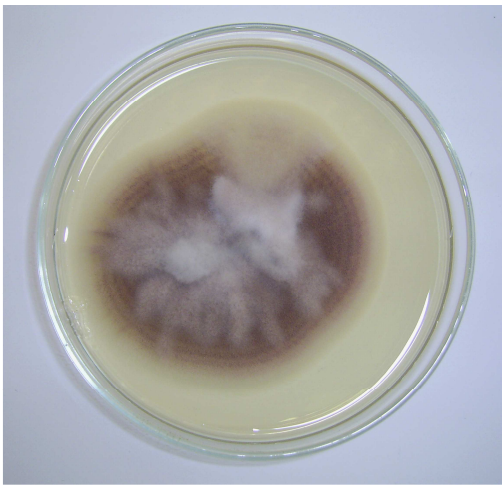
**1) Código:** ASC280

**2) Data de coleta:** 22/09/2008

**3) Identificação:** *Paecilomyces* sp.

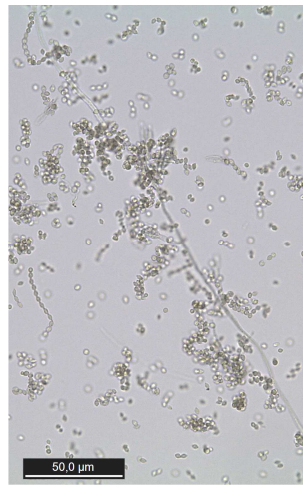
**4) Origem:** Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m - 22° 44' 25,3" (WO)  
47° 07' 35,2" (S)

**5) Macroscopia da colônia:**

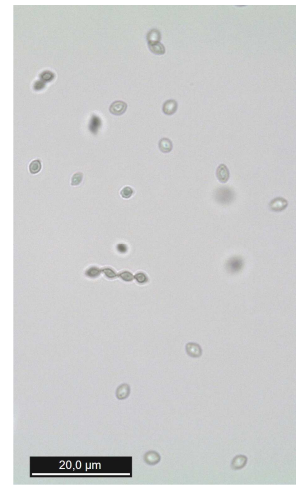


Em MA2%: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.

**6) Microscopia:**



Micélio e conídios.



Conídios em detalhe.

**7) Medições:**

Em andamento.

**8) Observações:**

Aguardando resultado do sequenciamento.

**9) Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC409

2) **Data de coleta:** 14/01/2009

3) **Identificação:** *Penicillium janthinellum* Biourge

4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**



Em MEA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conidióforos.  
Objetiva: 100x.



Conídios. Objetiva:  
100x.

7) **Medições:**

- diâmetro de colônia: 6,1 – 6,2 cm
- conídios: 4 – 5 µm de diâmetro
- fiálides: 11 – 13 µm de comprimento
- métulas: 8 – 14 µm
- conidióforos: não foi possível medi-los

8) **Observações:**

Não cresce em CYA a 25°C.

Em MEA – subgênero *Furcatum*

- Micélio branco e esverdeado;
- Conídios verde-claro a acinzentados, globosos, lisos a finamente rugosos;
- Fiálides ampuliformes, do tipo *long-neck*;
- Conidióforos de paredes lisas, penicílios irregularmente bi e monoverticilados
- Sem exsudatos;
- Superfície da cultura flocosa, acinzentada;
- Reverso branco.

9) **Referência bibliográfica:**

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorph states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press Inc. 1979. 633p.

SAMSON, R.A. FRISVAD, J.C. ***Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and extrolites**. *Stud. Mycol.* Utrecht, v. 49, 2004. 260p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC265

2) **Data de coleta:** 10/09/2008

3) **Identificação:** *Phialophora* sp.

4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em PDA: colônia de 14 dias de incubação a 27°C. Fonte: <[http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/p/Phialophora\\_richardisiae\\_colony\\_PDA.htm](http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/p/Phialophora_richardisiae_colony_PDA.htm)>.

Conidióforos.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Aguardando resultado do sequenciamento.

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Aberystwyth: Cambrian Printer LTD. 1989. 507p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC340

2) **Data de coleta:** 12/11/2008

3) **Identificação:** *Scedosporium apiospermum*

4) **Origem:** Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.



Picnídio e conídios.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

F – região ITS:

```
TTGAATTTTACAGCGGATTACAGTTCTGATTTGAAAAGAAAAACAAGTTAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCCGGGCATGCCTGTCC
GAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCTCCGTTTCTCAGGGAAGCTCAGGGTTCGGKGTGGGGCGCTA
CGGCGAGTCTTCGCGACCCTCCGTAGGCCCTGAAATACAGKGGCGGTCCCGCCGCGGTTGCCTTCT
GCGTAGTAAGTCTTTTTGCAAGCTCGCATTGGGTCCCGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCACCTAT
AACTCCAGATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGG
```

9) **Referência bibliográfica:**

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC332

2) **Data de coleta:** 28/10/2008

3) **Identificação:** *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis et al.

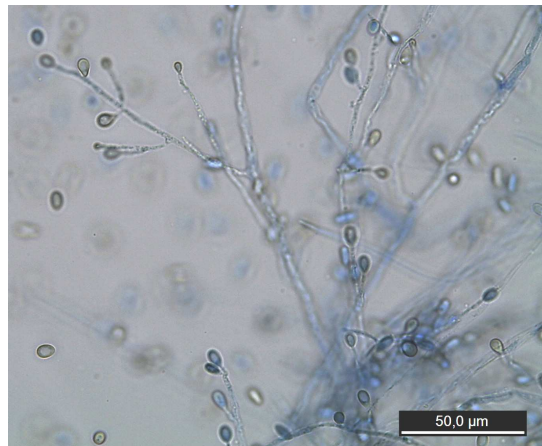
4) **Origem:** Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 10 dias de incubação a 25°C.



Conídios (fase assexuada).

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS

```
TCATTACAGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGAACCTTACCTATGTTCTGTTGCCTCGGCGGCGTGGTCAGCG
CCCCCTCTGAAAAGAGGACGATGCCCTCCCGCCGGCAGCACCAAACCTCTTTGAATTTTACAGCGGATTACAGTT
CTGATTTGAAAACAAAAACAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG
GCAGTAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTC AACCTCGAACCTCCGTTTCCTCAGGGAAGCTCAG
GGTCGGTGTGGGGCGCTACGGCGAGTCTTCGCGACCCCTCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCC GCCG
CGGTTGCCTTCTGCGTAGTAAGTCTCTTTTGCAAGCTCGCATTGGGTCCC GGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCAC
CTATAACTCCAGATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
```

Foi encontrado outro representante desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC285	22/09/2008	Ponto 6 – efluente industrial bruto - 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

9) **Referência bibliográfica:**

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus. 720p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC345

2) **Data de coleta:** 12/11/2008

3) **Identificação:** *Scopulariopsis* sp.

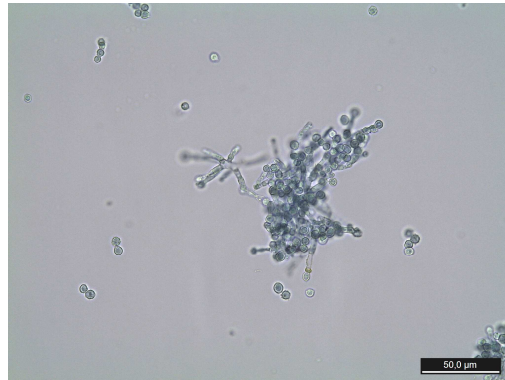
4) **Origem:** Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m - 22° 44' 25,3" (WO)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.



Conídios.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Foi encontrado outro representante desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC319	28/10/2008	Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

Aguardando resultado do sequenciamento.

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



## FICHA CATALOGRÁFICA

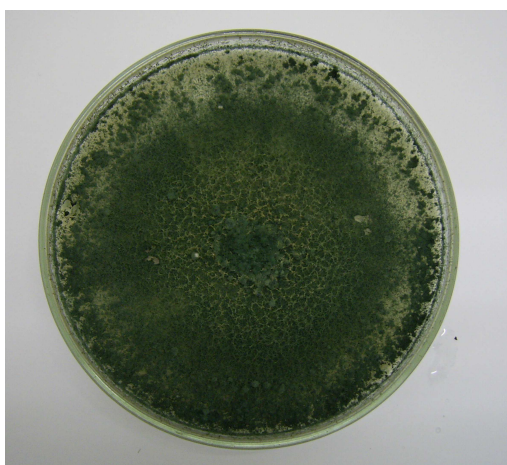
1) **Código:** ASC448

2) **Data de coleta:** 17/02/2009

3) **Identificação:** *Trichoderma harzianum* Rifai

4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa - 22° 44' 22,0" (WO)  
47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

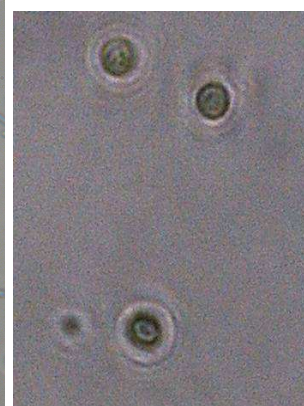


Em OA: colônia de 30 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Conidióforos. 40x



Conídios. Objetiva: 100x.

7) **Medições:**

- conídios: 2,03 – 2,82 x 3,16 – 3,61 μm
- fiálides: 6,78 – 11,3 μm de comprimento
- clamidosporos: 2,26 – 2,37 x 3,16 – 3,5 μm

8) **Observações:**

- conídios pequenos, subglobosos, muito semelhantes aos clamidosporos, paredes lisas;
- fiálides com base constricta, “pescoço” relativamente longo (1 a 1,5 μm de comprimento), algumas lageniformes, aparecem em grupos ou isoladas, saído diretamente do ramo principal;
- hifas grossas e ausência de hifas alongadas estéreis.

9) **Referência bibliográfica:**

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: III Section *Pachybasium*. **Can. J. Bot.** Ottawa, v.69, p. 2373-2417, 1991.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.





## FICHA CATALOGRÁFICA

- 1) **Código:** ASC367  
 2) **Data de coleta:** 15/12/2008  
 3) **Identificação:** *Chaetomella* sp. Fuckel  
 4) **Origem:** Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)  
 5) **Macroscopia da colônia:**  
 6) **Microscopia:**



Em PDA: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.



Picnídio e conídios.

### 7) Medições:

Em andamento.

### 8) Observações:

F – região ITS:

```
TTTCTTGATGTATGACCGGTTGCCTTGCCTTCGGGCAGCATTATTCTGATACTAgTTGCTGAGTATACTTTAAT
AAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAT
GTGAATTGCAGACACCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCC
TGTTTCGAGCGTCATTACACCTTCTACAAAGGTTTTGGGGATGGCACAGCCGCCCTTAAAAAGCTTGGTGGTAAC
TGGAACCCACGCACAGTAATCTCTGCGAAGGCGACCAGGTA AACACCGAAAACCTTCTGTTTGACCTCGGAT
CAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAG
TAACGGCGAGTGAAGCGCAACAGCTCAAATTTGAAACCTGCCAACCGCCGGATTGTAATTTGCAGAGGATG
CTTT
```

### 9) Referência bibliográfica:

ROSSMAN, A.Y. et al. The coelomycetous genera *Chaetomella* and *Pilidium* represent a newly discovered lineage of inoperculate discomycetes. *Mycological Progress*. Tübingen, 2004, n. 3, v. 4, p. 275-290.

SUTTON, B.C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata*. Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.

1: Fonte: < <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/Bot201/Deuteromycota/Deuteromycota.htm>>



## FICHA CATALOGRÁFICA

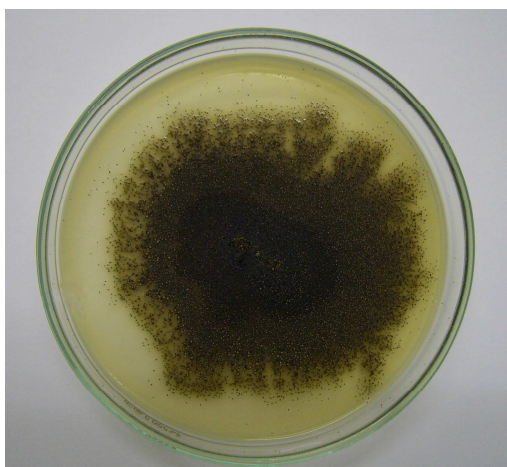
1) **Código:** ASC424

2) **Data de coleta:** 01/08/2007

3) **Identificação:** *Colletotrichum complexo gloeosporioides*

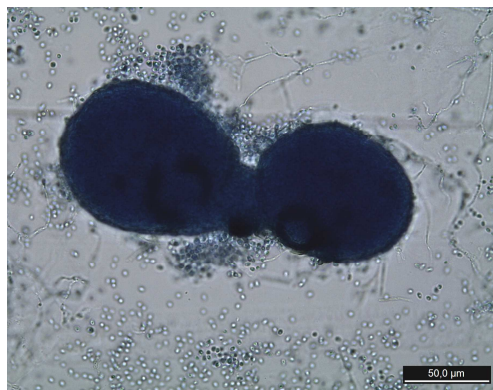
4) **Origem:** Ponto 2 – efluente industrial tratado biologicamente 22° 44' 26,6" (WO) 47° 07' 17,5" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**



Em MA2%: colônia de 45 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Picnídio e conídios.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Foram encontrados outros representantes desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC177	02/04/2008	Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)
ASC237	28/08/2008	Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)
ASC306	15/10/2008	Ponto 4 – 200 m a montante no Rio Atibaia - 22° 44' 43,0" (WO) 47° 07' 25,3" (S) – 200 m
ASC342	12/11/2008	Ponto 4 – 200 m a montante no Rio Atibaia - 22° 44' 43,0" (WO) 47° 07' 25,3" (S) – 200 m

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata**. Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC457a

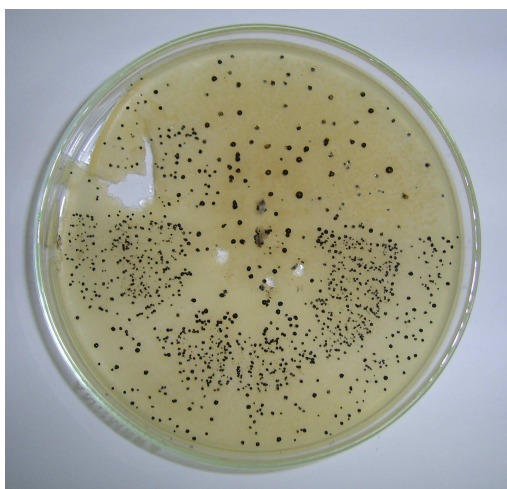
2) **Data de coleta:** 10/03/2009

3) **Identificação:** *Cytospora variostromatica*

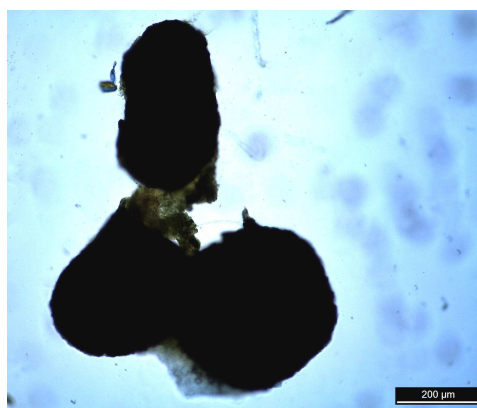
4) **Origem:** Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S).

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 25 dias de incubação a 25°C.



Picnídio.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS

```
TAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTGCTGGAAGCGCCGCAAGGTGCACCCAGAAACCCTTTGTGA
ACTTATACCATATCGTTGCCTCGGCGCTGGCTGCCCTTCCCTCCTGTGGAAGGGGCCCTCCCGGT
CGTAAAACCCAGGAGAGGACAGCAGGCCCGCCGGTGGCCTTCTAAACTCTTGTTTTTACCGAGTA
AATTCTGAGTAAGCTTCTAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCC
TAGCTTGGTGTGGGGCACTACCCGACCTCACGGTACGGTAGGCCCTGAAATTCAAGTGGCGAGCTC
GCCAGGACTCCGAGCGCAGTAGTGTAACCTCGCTTTGGATAGTACTGGCGCGGCCTAGCCGTTAA
ACCCCAACTTCTGAAAATTTGACCTCGGATCA
```

9) **Referência bibliográfica:**

ADAMS, G.C. et al. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*. **Stud. Mycol.** Utrecht, v.52, p. 1-144, 2005.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata.** Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC363

2) **Data de coleta:** 27/11/2008

3) **Identificação:** *Stagonosporopsis cucurbitacearum*

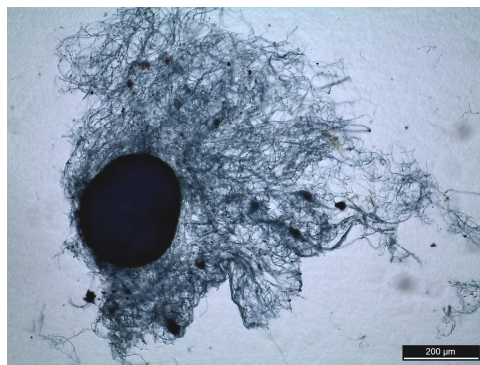
4) **Origem:** Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.



Picnídio.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS:

```
TGCCATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTACGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGTTGGAC
AACACTTAAACCCTTTGTAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAGTTACAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACT
CGCCTCAAAAACGATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTC
ACCACGACGACGTCCAAAAAGTACATTTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC
TGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAG
TGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTCGGCGTCCGAGTTGTAATTTGCAGA
```

9) **Referência bibliográfica:**

AVESKAMP, M. Highlights of the Didymelaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Stud. Mycol.** Utrecht, v.65, 2007, 68p.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC234                      2) **Data de coleta:** 30/07/2008 (6ª coleta)

3) **Identificação:** *Pestalotiopsis* sp.

4) **Origem:** Ponto 5 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 200 m  
22° 44' 25,3" (W) 47° 07' 35,2" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**



Em OA: colônia de 15 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Objetiva: 100x

7) **Medições:**

- Conídios: 19 – 25 µm de comprimento.

8) **Observações:**

Em OA:

Presença de esporodóquios negros imersos em micélio branco esparso e baixo.

Conídios fusiformes, retos, com 5 células, 3 delas internas e pigmentadas. Três septos, bi-setulado (2 apêndices apicais) e 1 apêndice basal.

Foi encontrado outro representante desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC254	10/09/2008	Ponto 2 – Efluente tratado biologicamente na entrada da lagoa de estabilização

9) **Referência bibliográfica:**

CROUS, P.W. ET AL. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 2009. 269 p.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata**. Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC394

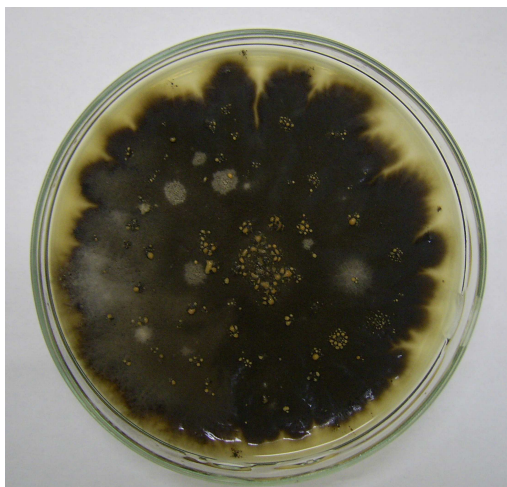
2) **Data de coleta:** 15/12/2008

3) **Identificação:** *Phoma herbarum* Westend

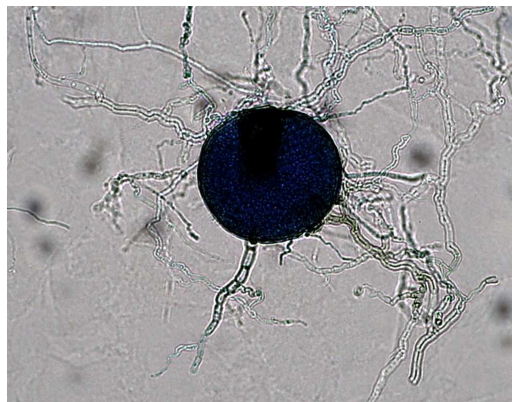
4) **Origem:** Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: colônia de 30 dias de incubação a 25°C.



Picnídio. Objetiva: 20x

7) **Medições:**

- Conídios: 1,5 x 1,0 – 3,0 µm
- Picnídios: 4,0 – 10,0 µm de diâmetro

8) **Observações:**

Superfície aveludada, marrom escura, margens baixas;  
 Clamidósporos observados simples e multi-septados;  
 Sem reação do meio a NaOH;  
 Picnídios sem setas, parede fina, célula conidiogênica difícil de ser observada.

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata**. Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC375

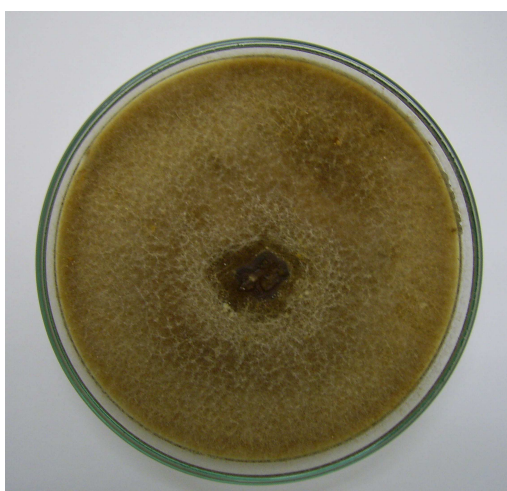
2) **Data de coleta:** 15/12/2008

3) **Identificação:** *Coprinellus radians*

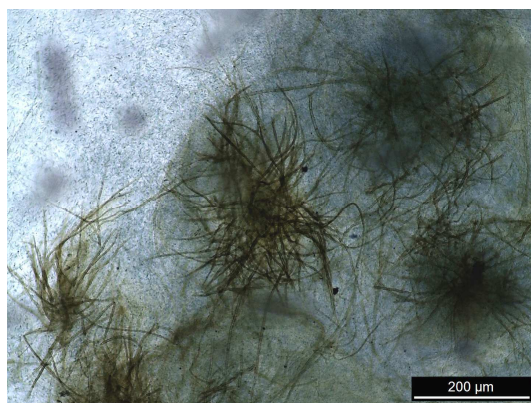
4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO)  
47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA2%: colônia de 40 dias de incubação a 25°C.



Picnídios.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS:

```
TGGCTCCTCGGAGCAATGTGCACGCCGCCATTTTTATCTTTCCACCTGTGCACCGACTGTAGGTCT
GGATACCTCTCGCCTCCGGGCGGATGCgAGGGTTGCTCGAAAGGGCTTCCCTTGAACCTCCAGGCTC
TACGTCTTTTTACACACCCCAATAGTATGATGCAGAATGTAGTCAATGGGCTTCTCAGCCTATAAAA
CACTATACTTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTA
TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTTCATTAAATTCTCAACCTCACCAGTTTTCTGAACTGACTGA
GGCTTGGATGTGGGGGTTTGTGCAGGCTGCCTCACGGCGGTCTGCTCCCCTGAAATGCATTAGCGA
GGTTCATGCTGGACCTCCGTCTATTGGTGTGATAAT
```

9) **Referência bibliográfica:**

ARANDA, E.; KINNE M.; KLUGE M.; ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82, n. 6, p. 1057-1066, 2009



## FICHA CATALOGRÁFICA

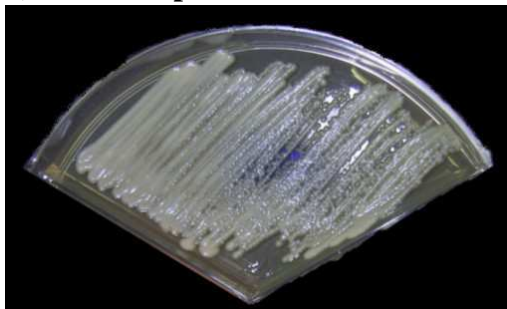
1) **Código:** ASC243

2) **Data de coleta:** 28/08/2008

3) **Identificação:** *Cryptococcus diffluens* (Zach) Lodder & Kreger-van Rij

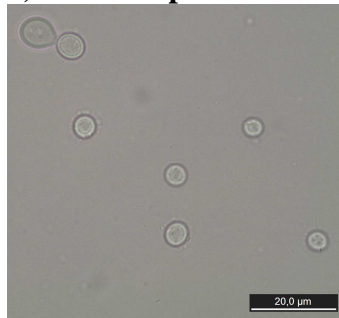
4) **Origem:** Ponto 1 – Rio Jaguari - 22° 42' 00,0" (WO) 47° 08' 06,6" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**



Em SAB: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.

6) **Microscopia:**



Células.

7) **Medições:**

Em andamento.

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2:

```
AGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAA
TCTAGTAGCCTTCGGCTGCTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGTTTTCCGTGCCGGCCATGTACAAGTCCCTTG
GAACCAGGGCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCCTTGACATGGACCCCGGTGCTCTGTGATACACTTTCAA
CGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAATGGGTGGTGAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA
CCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAAT
TGTTGAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGTCATGCTCTTTGGTATTTATATCATTGAGTGGGGTCAACATCAGTTT
TGAGCGATGGATAAAGGCACTAGGAAGGTAGCACTCTCGGGTGAAC TTATAGCCTAGCGTCATATACATTGTT
TGGGACTGAGGAACGCAGCATGCCTTGATGGCCGGATTGGTCCACGTACATGCTTAGGATGTTGACATAATGG
CTTTAAACGACCCGCTTGAA
```

Testes de assimilação

**Positivo:** glicose, L-sorbose, sacarose, celobiose, melezitose, D-xilose, L-rhamnose, D-glucitol, salicina, DL-lactato, imidazole, 2-ceto-D-gluconato, D-glucoronato, nitrato, nitrito, cadaverina, L-lisina, D-glicosamina (fonte N), *vitamin-free*.

**Fraco:** galactose, maltose, D-arabinose, etanol, glicerol, galactiol, D-manitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, citrato, inositol.

**Negativo:** trealose, lactose, melibiose, rafinose, inulina, amido solúvel, L-arabinose, D-ribose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, metanol, eritritol, ribitol, gluconato, creatina, xilitol, L-arabinitol, propano 1,2 diol, butano 2,3 diol, creatinina, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%, acetato de etila, D-glucono-lactona.

9) **Referência bibliográfica:**

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.





## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC239

2) **Data de coleta:** 28/08/2008

3) **Identificação:** *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) F.C. Harrison

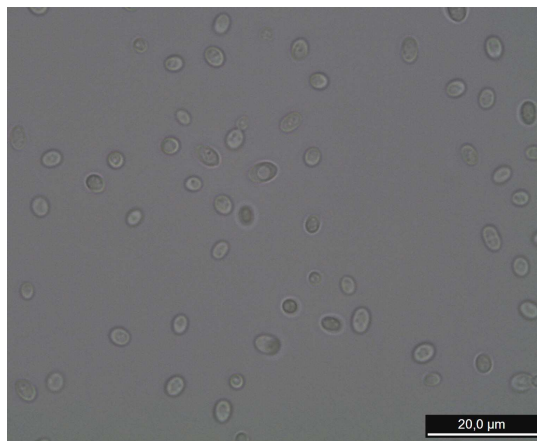
4) **Origem:** Ponto 8 – jusante do efluente no Rio Atibaia – 800 m - 22° 44' 22,3" (WO) 47° 07' 40,8" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Em MA 2%: cultura de 7 dias de incubação a 25°C.



Células de 7 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Células: 2,5-6,5 x 6,5-14,0 µm.

8) **Observações:**

Consenso – região D1/D2

TACAACAGGGATCCCCTAGTAGCGGCGAGCGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTATAATCTGGCACCTTCGGTGT  
CCGAGTTGTAATCTCTAGAAATGTTTTCCGCGTTGGACCGCACACAAGTCTGTTGGAATACAGCGGCATAGTGG  
TGAGACCCCGTATATGGTGCAGCGCCAGCGCTTTGTGATACATTTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTGGGAATG  
CAGCTCAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTG  
AGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGTTGGAAGGGAAACGCTTGAAG  
TCAGACTTGCTTGCCGAGCAATCGGTTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCCGGGATGGATAATGGTAGAGAGAAG  
GTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTGCTGGATACATCTGGGGGACTGAGGAACGCAGTGTGCCTTTGG  
CGGGGTTTCGACCTTTCACACTTAGGATGCTGGTGAATGGCTTTAAACGACCCGCTCTG

Foi encontrado outro representante desse táxon:

Código	Data de coleta	Local de isolamento
ASC328	28/10/2008	Ponto 6 – efluente industrial bruto 22° 44' 18,8" (WO) 47° 07' 19,2" (S)

Testes de assimilação:

**Positivo:** glicose, galactose, L-sorbose, sacarose, trealose, rafinose, melezitose, D-xilose, D-arabinose, D-ribose, etanol, glicerol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, salicina, imidazole, xilitol, cadaverina, L-lisina, D-glicosamina (fonte N), *vitamin-free*, D-glucono-lactona.

**Fraco:** maltose, celobiose, gluconato, 2-ceto-D-gluconato, L-arabinitol, nitrato, nitrito.

**Negativo:** lactose, melibiose, inulina, amido solúvel, L-arabinose, L-rhamnose, D-glicosamina, N-acetil D-glicosamina, metanol, ertritol, galactitol,  $\alpha$ -metil D-glicosídeo, DL-lactato, citrato, inositol, creatina, D-gluconato, propano 1,2 diol, butano 2,3 diol, creatinina, ciclo-heximida 0,01%, ciclo-heximida 0,1%, acetato de etila.

9) **Referência bibliográfica:**

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1139p. 2000.



## FICHA CATALOGRÁFICA

1) **Código:** ASC320b

2) **Data de coleta:** 28/10/2008

3) **Identificação:** *Trametes versicolor* Samson

4) **Origem:** Ponto 3 – efluente tratado e estabilizado em lagoa 22° 44' 22,0" (WO) 47° 07' 43,0" (S)

5) **Macroscopia da colônia:**

6) **Microscopia:**



Colônia estéril.

Em OA: colônia de 7 dias de incubação a 25°C.

7) **Medições:**

Aguardando esporulação.

8) **Observações:**

Consenso – região ITS

TGCGGAAGGATCATTAAACGAGTTTTGAAACGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCC  
TGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGTTTCTGGCCTCCGGGTCAGAA  
GCATTCTGCCGACCTATGTACTACTACAACTCTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCAT  
CTTAATAACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA  
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGA  
TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTGATGAAATTCTCAACCCATAAATCCTTGTGATCTATGGGC  
TTGGATTTGGAGGCTTGCTGGCCGTAACGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCCGTGCG  
GATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGT  
CCATTAGGACAATTTTATAACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA  
TCAA

9) **Referência bibliográfica:**

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.

PHILLIPS, R. Mushrooms and other fungi of Great Britain and Europe. London: Macmillan Reference, 1994. 288p.

Os táxons apresentados nas fichas catalográficas encontram-se listados na tabela 5, correlacionando os pontos onde ocorreram.

**Tabela 5.** Distribuição dos táxons isolados das amostras de água, dos pontos estudados na região de Paulínia, no período entre agosto de 2007 e março de 2009.

Táxon	Pontos de coleta							
	1	2	3	4	5	6	8	
<i>Acremonium breve</i>		X						
<i>Aspergillus flavus</i>						X		
<i>Aspergillus fumigatus</i>		X		X		X		
<i>Aspergillus niger</i>			X					
<i>Aspergillus parasiticus</i>						X		
<i>Aspergillus sp.</i>		X						
<i>Aspergillus versicolor</i>		X						
<i>Candida glabrata</i>					X			
<i>Candida parapsilosis</i>	X							
<i>Candida pseudointermedia</i>						X		
<i>Candida pseudolambica</i>						X		
<i>Candida sp.</i>						X		
<i>Candida tropicalis</i>						X		
Celomicetos a identificar	X	X	X	X		X	X	
<i>Chaetomella sp.</i>	X							
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Cladosporium sp.</i>			X	X	X		X	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		X	X	X		X	X	
<i>Coniochaeta pulveraceae</i>						X		
<i>Coprinellus radians</i>			X					
<i>Cryptococcus diffluens</i>	X							
<i>Cytospora variostromatica</i>							X	
<i>Epicocum nigrum</i>		X	X					
<i>Eutypella sp.</i>			X					
<i>Exophiala dermatitidis</i>						X		
FNE	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Fusarium oxysporum</i>		X						
<i>Fusarium solanii</i>						X		
<i>Fusarium sp.</i>	X	X	X	X		X	X	
<i>Galactomyces reessii</i>						X		
<i>Geotrichum klebahnii</i>						X		
<i>Geotrichum sp.</i>						X		
<i>Graphium sp.</i>						X		
<i>Hyphopichia burtonii</i>					X			
<i>Kazachstania exigua</i>						X		
Leveduras a identificar			X		X	X		
<i>Mariannea camptospora</i>							X	
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>		X	X	X	X		X	

**Tabela 5.** Continuação.

Táxon	Pontos de coleta							
	1	2	3	4	5	6	8	
<i>Mucor</i> sp.	X		X		X	X		
<i>Paecilomyces</i> sp.		X			X	X		
<i>Penicillium brevicompactum</i>							X	
<i>Penicillium implicatum</i>		X						
<i>Penicillium janthinellum</i>			X					
<i>Penicillium rugulosum</i>				X				
<i>Penicillium</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Pestalotia</i> sp.					X			
<i>Phialophora</i> sp.						X		
<i>Phoma herbarum</i>							X	
<i>Phoma macrostoma</i>							X	
<i>Phoma</i> sp.	X		X		X			
<i>Phomopsis</i> sp.		X						
<i>Pichia jadinii</i>						X		
<i>Pichia kudriavzevii</i>						X		
<i>Pseudallescheria boydii</i>						X		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		X				X		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		X		X				
<i>Saccharomyces exiguus</i>						X		
<i>Scedosporium apiospermum</i>		X						
<i>Scopulariopsis</i> sp.		X			X			
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>							X	
<i>Trametes versicolor</i>			X					
<i>Trichoderma anamórfico Hypocrea</i>	X	X		X	X			
<i>Trichoderma aureoviridae</i>	X							
<i>Trichoderma harzianum</i>			X				X	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	X				X			
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	X							
<i>Trichoderma</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Williopsis</i> sp.						X		
<b>Total de táxons por ponto</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	

Durante o desenvolvimento deste trabalho verificou-se alterações morfológicas de várias culturas após repiques sucessivos, dificultando o processo de identificação. Isso pode acontecer em função da disponibilidade de nutrientes que o micro-organismo encontra no meio de cultura, diferente de seu ambiente, influenciando diretamente sua morfologia (TORTORA et al., 2007). Muitos fungos apresentaram-se não esporulantes. Como a forma micelial constitui uma maneira rápida de garantir a proliferação dos mesmos com menor gasto de energia, acredita-se que a não esporulação favoreça a sobrevivência de espécies que se encontrem sob estresse ambiental constante.



A condição impactada do local de estudos, com presença de compostos complexos, levou inicialmente à hipótese de que uma baixa diversidade de espécies seria encontrada. No entanto, os resultados apresentados mostraram diversidade relativamente abundante de fungos transientes, na maioria terrestres (geofungos), que de alguma maneira podem atingir o substrato aquático pelo vento, pela chuva e lixiviação do solo, ou ainda, transportados por outros seres vivos (TAKAHASHI, 2009).

Apesar das alterações conhecidas, o ambiente apresentou espécies alóctones que podem contribuir para a decomposição e reciclagem da matéria orgânica. Mesmo em ambiente aquático, geofungos são capazes de se manter viáveis e se fixar em substratos orgânicos submersos, além de atuarem na sua decomposição, mesmo que lentamente. A literatura menciona, porém, que essa atividade decompositora em tais ambientes necessita maior elucidação, pois ainda trata-se de um processo pouco compreendido (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2004).

Enquanto a maioria das amostras foi diretamente inoculada nos meios de cultura, as dos pontos coletados no Rio Atibaia necessitaram diluição. Isto demonstrou maior número de unidades formadoras de colônias nestas amostras, bem como de diversidade de espécies, principalmente de fungos filamentosos, exceto no ponto 6.

Esta pesquisa registrou uma larga amplitude de táxons, Tabela 5; foi notória tanto a presença de gêneros reconhecidamente cosmopolitas e abundantes, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, como de representantes característicos de ambientes preservados (ex. *Phoma*) e fungos considerados menos comuns (*Exophiala dermatitidis* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os grupos predominantes apresentaram diversas espécies. Fungos não esporulantes (FNE) ocorreram em todos os pontos.

Resultados semelhantes foram obtidos no Córrego do Sapateiro do Parque Municipal do Ibirapuera, São Paulo, SP, onde se investigou a ocorrência de micobiota terrestre em suas águas (TAKAHASHI, 2009), e no Açude do Prata e no Açude do Meio, em Recife, PE (CAVALCANTI, 2001). Apesar da coincidência de táxons, esses estudos apresentaram diversidade relativamente baixa de espécies em cada gênero, se comparado ao presente trabalho.

Alguns pontos de coleta apresentaram características particulares quanto às estirpes ocorrentes. No Rio Jaguari (ponto 1), registrou-se a ocorrência exclusiva da levedura *Candida parapsilosis*, de importância médica, geralmente encontrada formando biofilmes em equipamento protético (de HOOG et al., 2000). Como mencionado, o ponto 1 foi incluído no estudo como uma referência por apresentar, teoricamente, águas menos alteradas. A presença

de *C. parapsilosis* somente nestas amostras foi considerada preocupante do ponto de vista sanitário, já que o rio Jaguari é a fonte de abastecimento de água não só dos processos industriais da refinaria, como também de consumo para os funcionários. Deste resultado, concluiu-se que uma nova pesquisa deve ser iniciada para o esclarecimento desta questão.

A maioria das leveduras, entretanto, foi encontrada apenas nas amostras do efluente industrial bruto (ponto 6): *Candida pseudointermedia*; *C. pseudolambica*; *C. tropicalis*; *Exophiala dermatitidis*; *Galactomyces reessii*; *Geotrichum klebahnii*; *Kazachstania exigua*; *Pichia jadinii*; *P. kudriavzevii*; *Saccharomyces exiguus* e *Williopsis* sp. Análises físicas e químicas mostraram que o efluente bruto apresenta maior quantidade de hidrocarbonetos complexos derivados do processo de refino do petróleo (ANGELIS et al., 2008), o que sugere que as estirpes nele encontradas sejam resistentes a estas condições e podem ser recomendadas para estudos futuros de biorremediação.

Destacou-se a ocorrência de *Microsphaeropsis arundinis* pela sua frequência. O isolamento deste fungo foi observado no interior da refinaria (pontos 2 e 3) e no rio Atibaia, somente a jusante (pontos 5 e 8). Supõe-se que esta espécie de celomiceto tenha se adaptado às condições da refinaria, sendo posteriormente carregado para o rio pelo efluente. A variação nas características macroscópicas dos isolados de *M. arundinis* observada neste estudo pode indicar que, apesar de viável, o fungo mostrou-se sensível às perturbações existentes nas amostras coletadas. Na natureza, o fungo parece estar associado a plantas, porém recentes investigações têm relatado casos de infecções em humanos (PENDLE et al., 2004).

A presença de uma estirpe de *Scedosporium apiospermum* e seu teleomórfico *Pseudallescheria boydii* destacou-se por não haver relatos anteriores de seu isolamento em ambiente aquático. Trata-se de uma espécie conhecidamente oportunista e por causar problemas respiratórios. A ocorrência desse fungo no ambiente estudado foi visto com grande interesse por pesquisadores da área médica, pois a espécie apresenta inúmeros registros de casos clínicos tendo sido registrado em ambiente aquático pela primeira vez (de HOOG, comunicação pessoal). As estirpes isoladas serão enviadas para uma coleção de culturas internacional e farão parte de uma amostragem focada na ecologia desse fungo

A ocorrência frequente de celomicetos do gênero *Phoma* destacou-se pelo fato de ser um grupo que apresenta espécies tipicamente fito e entomopatógenas (DOMSCH et al., 1993).

*Acremonium breve* é comumente isolado de tecidos vegetais mortos e do solo, apresenta enorme faixa de distribuição mundial e é amplamente utilizado no controle biológico de fungos causadores de podridão em frutas e outras plantas cultivadas na agricultura, graças à sua intensa ação antagônica contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium*

*expansum* (JANISIEWICZ, 1988; SAMSON et al., 2004). Sua ocorrência limitou-se ao ponto 2 (entrada da lagoa de estabilização), no entanto não foi detectado nenhum fator preponderante que pudesse explicar este resultado.

O fungo *Aspergillus flavus* é comumente encontrado viável em ambientes aquáticos, embora o gênero constitui um grupo terrestre (SAMSON et al., 2004). No entanto, é capaz de degradar substratos celulolíticos nos dois ambientes, contribuindo para a decomposição de matéria orgânica nesse sistema (PARK, 1972). A presença desta estirpe no efluente bruto, ponto 6 (Tabela 5), concorda com a literatura que relata sua alta tolerância por *n*-alcanos e a utilização de hidrocarbonetos provenientes de derivados de petróleo (DOMSCH et al., 1993).

Termotolerante e cosmopolita, a espécie *Aspergillus fumigatus* é mencionada como um potente contaminante. Foi encontrado em amostras coletadas dentro e fora da refinaria. Trata-se de um fungo altamente capaz de degradar hidrocarbonetos complexos e produz importantes metabólitos de ação antibiótica como fumigacina, gliotoxina, e ferricrocina. Contudo, devido aos fatores de virulência que possui, sua aplicação biotecnológica é pouco explorada, uma vez que sua manipulação precisa ser cautelosa (DOMSCH et al., 1993; de HOOG et al., 2000).

O acompanhamento das condições dos locais de coleta vem sendo desenvolvido desde 1997, como dito anteriormente; no entanto, este foi o primeiro estudo sobre a ocorrência das espécies fúngicas transientes. Pesquisas anteriores apenas revelaram o número de UFCs ao longo do tempo (assunto abordado no capítulo 2), de acordo com as medidas adotadas para controle e diminuição dos impactos provocados no ambiente estudado.

Como uma contribuição deste trabalho para a utilização das estirpes obtidas, na Tabela 6 encontra-se a importância e algumas aplicações que os táxons isolados apresentam. Espera-se que novos projetos possam ser formulados a partir destes resultados.

**Tabela 6.** Importância econômica e aplicações dos táxons isolados.

<b>Táxon</b>	<b>Importância e Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Acremonium breve</i>	Biocontrole de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Penicillium expansum</i> .	Janisiewicz, 1988.
<i>Aspergillus flavus</i>	Biorremediação, produção de enzimas termoestáveis.	Gomes et al., 2007.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pesquisas sorológicas.	Ferreira, 2008.
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de enzimas de interesse industrial e farmacêutico.	Domsch et al., 1993. Ruegger;Tauf-Tornisiello, 2004.

**Tabela 6.** Continuação.

<b>Táxon</b>	<b>Importância e Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Produção de enzimas para fermentação.	Shivam et al., 2009.
<i>Aspergillus versicolor</i>	Produção de enzimas de interesse industrial e farmacêutico.	Domsch et al., 1993. Ruegger;Tauf-Tornisiello, 2004.
<i>Candida glabrata</i>	Produção de biossurfactantes.	Luna et al., 2009.
<i>Candida parapsilosis</i>	Produção de proteinases; pesquisa em micologia médica.	Braga et al., 1998.
<i>Candida pseudointermedia</i>	Fermentação de café.	Masoud et al., 2004.
<i>Candida pseudolambica</i>	Produção de micocinas.	Vital et al., 2002.
<i>Candida tropicalis</i>	Degradação de fenol.	Ding et al., 2010.
<i>Chaetomella sp.</i>	Interesse médico.	Vera, 1975.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Utilização em testes de resistência de materiais têxteis e tintas.	Onions et al., 1981.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Produção de enzimas pectinolíticas.	Domsch et al., 1993.
<i>Coniochaeta pulveraceae</i>	Estudos taxonômicos e ecológicos	Não encontrada
<i>Coprinellus radians</i>	Conversão de dibenzotiofeno	Aranda et al., 2009
<i>Cryptococcus diffluens</i>	Interesse médico.	Kantarcioğlu, 2007.
<i>Cytospora variostromatica</i>	Fitopatógeno.	Adams et al., 2005
<i>Epicocum nigrum</i>	Produção de antibióticos.	Gravesen et al., 1994.
<i>Eutypella sp.</i>	Estudos taxonômicos e ecológicos.	Não encontrada
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Interesse médico.	de Hoog et al., 2000.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fitopatógeno; de interesse industrial.	Domsch et al., 1993. Gravesen et al., 1994
<i>Fusarium solanii</i>	Fitopatógeno; de interesse industrial.	Domsch et al., 1993. Gravesen et al., 1994.
<i>Galactomyces reessii</i>	Produção de biomassa para nutrição animal.	Akyiama et al., 2001.
<i>Geotrichum klebahnii</i>	Produção de enzimas de interesse industrial.	Rojas et al., 2008.
<i>Graphium sp.</i>	Interesse médico.	de Hoog et al., 2000.
<i>Hyphopichia burtonii</i>	Biodeteriogênico em indústria de alimentos.	Samson et al., 2004.
<i>Kazachstania exigua</i>	Biorremediação de esgotos.	Liu et al., 2008.
<i>Mariannea camptospora</i>	Estudos taxonômicos e ecológicos.	Samson, 1974.
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	Controle biológico de <i>Venturia inaequalis</i> .	Mason & Huber, 2002.
<i>Mucor sp.</i>	Interesse médico; biodeteriogênico.	de Hoog et al., 2000. Samson et al., 2004.
<i>Paecilomyces sp</i>	Interesse médico; biodeteriogênico.	de Hoog et al., 2000. Samson et al., 2004.
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Produção de ácidos orgânicos.	Domsch et al., 1993.
<i>Penicillium implicatum</i>	Fitopatógeno.	Labuda et al., 2004.
<i>Penicillium janthinellum</i>	Produção de xilanases.	Rodrigues et al., 2004.

**Tabela 6.** Continuação.

<b>Táxon</b>	<b>Importância e Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Penicillium rugulosum</i>	Biodeteriogênico em indústria de alimentos.	Samson et al., 2004.
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Fitopatígeno; produção de celulase	Crous et al., 2009.
<i>Phialophora sp.</i>	Interesse médico.	de Hoog et al., 2000.
<i>Phoma herbarum</i>	Biodeteriogênico.	Onions et al., 1981.
<i>Phoma macrostoma</i>	Fitopatígeno.	Crous et al., 2009.
<i>Phomopsis sp.</i>	Fitopatígeno.	Crous et al., 2009.
<i>Pichia jadinii</i>	Biomassa para nutrição animal.	Deak, 2009.
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Fermentação de cacau.	Daniel et al., 2009.
<i>Pseudallescheria boydii</i>	Interesse médico.	de Hoog et al., 2000.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Interesse médico.	de Simone, 2009.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Interesse médico; larga aplicação industrial.	de Llanos et al., 2006; Onions et al., 1981.
<i>Saccharomyces exiguus</i>	Estudos taxonômicos e ecológicos	Não encontrada
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Interesse médico.	de Hoog et al., 2000.
<i>Scopulariopsis sp.</i>	Biodeteriogênico; interesse médico.	Domsch et al., 1993.
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	Fitopatígeno.	Fiori et al., 2000.
<i>Trametes versicolor</i>	Biodegradação; interesse farmacêutico.	Singh, 2006.
<i>Trichoderma aureoviridae</i>	Produção de enzimas; biodegradação.	Zaldívar et al., 2001.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Biodegradação de herbicidas; biocontrole de <i>Candida albicans</i> .	Domsch et al., 1993.
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Produção de xilanases.	Royer & Nakas, 1989
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	Biodegradação; biodeterioração; produção de enzimas.	Gupta et al., 2009
<i>Trichoderma anamórfico</i>	Biodegradação; biodeterioração; produção de enzimas	Domsch et al., 1993.
<i>Hypocrea</i>		
<i>Williopsis sp</i>	Atividade antifúngica; produção de toxinas	Hodgson et al., 1995

A partir dos resultados e conclusões obtidos neste trabalho, algumas considerações puderam ser levantadas. O impacto provocado pela refinaria está sendo contornado pelo tratamento que realiza sobre seu efluente, indicando que os principais impactos no Rio Atibaia não podem ser atribuídos unicamente a ela.

Podemos ainda destacar como pontos relevantes desta pesquisa as seguintes considerações:

# Os micro-organismos aqui isolados permitirão a continuidade de avaliações de potenciais para outras aplicações biotecnológicas, uma vez que são provenientes de áreas impactadas.

# A fotodocumentação e a preservação das espécies microbianas representam um acervo cultural, técnico, científico e de acesso universal.

# As dificuldades enfrentadas na fase de identificação ressaltou a importância de constante atualização da literatura pertinente.

# Esta pesquisa contribuiu para o enriquecimento do acervo da coleção de culturas fúngicas do CEIS, assim como para sua organização mediante o aprimoramento das fichas catalográficas, que serão futuramente disponibilizadas *online*.

## 6. CONCLUSÕES

# A pesquisa mostrou que mesmo impactada, a região apresentou uma considerável diversidade de fungos durante o período estudado, ao contrário das expectativas iniciais.

# Diante desta diversidade pode-se inferir que muitas espécies de fungos transientes permanecem presentes mesmo sob condições adversas.

# A ocorrência das espécies *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus difluens*, encontradas exclusivamente nas amostras de água do rio Jaguari, devem ser investigadas quanto à distribuição dentro da refinaria.

# As espécies que ocorreram principalmente nas amostras do efluente bruto podem apresentar potencial para aplicação em biorremediação, embora haja a necessidade de estudos sobre possível potencial oportunista e patogênico das estirpes.

# Pela ocorrência com que foi encontrado na área e pela sua associação a casos de infecção humana, o fungo *Microsphaeropsis arundinis* deve ser melhor investigado.

# *Scedosporium apiospermum* e *Pseudallescheria boydii* constituem estirpes de interesse para estudos da área médica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.C. et al. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*. **Stud. Mycol.** Utrecht, v.52, p. 1-144, 2005.

AKIYAMA, S. et al. Assessments of palatability and availability for dietary yeasts in red sea bream (*Pagrus major*). **Suisan Zoshoku**. [S.l.], v. 49, n° 1, p. 47-52, 2001.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. Hoboken: John Wiley & Sons, Pub., 1996. 233 p.

ALL SPECIES FOUNDATION. Disponível em: <<http://www.all-species.org/>>. Acesso em: 21 set. 2009.

ALMEIDA, J.M.G.C.F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiol. Ecol.** Oxford, n. 53, p. 295-303, 2005.

ANGELIS, D.F. et al. Avaliação da toxicidade (atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica) do efluente final da refinaria e das águas do Rio Atibaia na região de influência do lançamento. **REPLAN – Relatório técnico final**. 2008. 220 f.

ARANDA, E. et al. Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Berlin, v. 82, n. 6, p. 1057-1066, 2009.

ARX, J.A. von. **The Genera of Fungi Sporulating in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 351p.

ARX, J.A.; VAN DER WALT, J. P. The ascigerous state of *Candida chodatii*. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, n. 42, v. 3, p. 309-314, 1976.

AVESKAMP, M. Highlights of the Didymelaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Stud. Mycol.** Utrecht, v.65, 2007, 68p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 3. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241 p.



BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 1139p.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: III Section *Pachybasium*. **Can. J. Bot.** Ottawa, v.69, p. 2373-2417, 1991.

BONONI, V.L.R. (org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998. 184p.

BRAGA, W.F. et al. Terpenoids from *Copaifera cearensis*. **Phytochemistry**. New York, v.49, p. 263-264, 1998.

CABUK, A.; UNAL, A.T.; KOLANKAYA, N. Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*. **Biotechnol. Lett.** Dordrecht, v. 28, p. 1313-1317, 2006.

CAPELARI, M.; GUGLIOTTA, A. de M. **Estudo da diversidade de espécies de fungos macroscópicos do Estado de São Paulo**, 1996. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/info/historico/workshop/revisoes/fungos.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2008.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. 3 ed. London: Academic Press Ltd., 1996. 482p.

CAVALCANTI, M.S. **Fungos isolados da água e do solo das margens dos açudes do Prata e do Meio, na Reserva Florestal de Dois Irmãos, Recife-PE**. 2001. 316 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Botânica) – Instituto de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CBS – CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES. **CBS yeast collections**. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

CGEE - CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Ciência, tecnologia e inovação**. Disponível em: <[www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752](http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1752)>. Acesso em: 27 jul. 2009.

CLESCERI, L.S.; REENBERG, A.E.; EATON, A.D. ed. **Standard Methods for Examination of water and Wastewater**. 20th ed. Washington: American Public Health Association, 811p. 1998.

COLLINS, C.H., **Métodos microbiológicos**. Zaragoza: Acribia, 410p. 1969.

COLWELL, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** Hampshire, v. 18, p. 302–307, 1997.

CROUS, P.W. et al. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 2009. 269 p.

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Stud. Mycol.** Utrecht, v. 58, p. 1-253, 2007.

DANIEL, H-M. et al. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Res.** Amsterdam, v. 9, p. 774–783, 2009.

DEAK, T. **Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology**. IN: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. T. Satyanarayana & Gotthard Kunze Eds., 2009. 744p.

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 720p.

DE LLANOS, R.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; QUEROL, A. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, n. 90, p. 221-231, 2006.

de SIMONE, J. A. JR. *Rhodotorula mucilaginosa* catheter-related fungemia in a patient with sickle cell disease: case presentation and literature review. **Southern Medical Journal**. Birmingham, p.1-6, 2010.

DING, Y.; YUAN, X.Z.; ZENG, G.M.; LIU, Z.F.; ZHONG, H.; WANG, J. Effects of surfactants on the biodegradation of phenol by *Candida tropicalis*. **Huan Jing Ke Xue** v. 31, n. 4, p. 1047-52, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20527190>>. Acesso em: 02 abr. 2010.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1, 1993.120p.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Aberystwyth: Cambrian Printer LTD. 1989. 507p.

FERREIRA, R. R. **Pesquisa sorológica de *Aspergillus fumigatus* e cultivo fúngico de amostras obtidas de cães com descarga nasal.** Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/14331?show=full>>. Acesso em: 14 abr. 2010.

FIDALGO, O. Introdução à história da micologia brasileira. **Rickia**, Série Criptogâmica dos Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, vol. 1, p. 3-11, 1962.

FIDALGO, O. Rick, o pai da micologia brasileira. **Rickia**, Série Criptogâmica dos Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, vol. 3, p. 1-3, 1968.

FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **J. Phytopathology**. Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000.

GEISER, D.M. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Stud. Mycol.** Utrecht, n. 59, v. 1, p. 1-10, 2007.

GOI, S.R.; SOUZA, F.A. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**. Seropedica, v.13, n.2, p. 46-65, 2006.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. da. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 30, n. 1, 2007.

GRAVESEN, S.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Microfungi**. 1 ed. Viborg: Special-Trykkeriet, 1994. 168p.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.

GUPTA, V. P. et al. *Trichoderma pseudokoningii* for hastening the decomposition of various sericultural wastes and impact of enriched composts on disease suppression in mulberry (*Morus* spp.) **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. [S.l.], v. 42, n. 7, p. 603-609, 2009.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.** Cambridge, n. 95, p. 641-55, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity in microorganisms and its role in ecosystem function. In: SOLBRIG, O.T., EMDEN, H. M. van, OORDT, P.G.W.J. van (eds.). **Biodiversity and global change**. Paris: IUBS, 1992. p. 83-93.

HAWKSWORTH, D.L. et al. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8 ed. Wallingford: CAB International Mycological Institute, 1995. 616p.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.** Cambridge, n° 105, vol. 12, p. 1422-1432, 2001.

HODGSON, V.J.; BUTTON, D.; WALKER, G.M. Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. **Microbiology**. Reading, v. 141, p. 2003-2012, 1995.

ITIS – INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. Disponível em: <<http://www.itis.gov/>>. Acesso em: 21 set. 2009.

JANISIEWICZ, W.J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. **Phytopathology**. Saint Paul, n. 78, p. 194-198, 1988.

KANTARCIOĞLU, A.S. et al. Subcutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus diffluens* in a patient with sporotrichoid lesions case report, features of the case isolate and *in vitro* antifungal susceptibilities. **Med. Mycol.** Oxford, v. 45, n. 2, 173-181, 2007.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1988. 116p.

KRIEGER, H. et al. Área de Ciências Biológicas. **Parcerias estratégicas**. Academia Brasileira de Ciências: Edição especial. Brasília: MCT, Centro de estudos estratégicos. Disponível em: <<http://java.cgee.org.br/kmmsearch/download?doc=200806040437202.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2009.

LABUDA, R. et al. *Penicillium implicatum* causes a destructive rot of pomegranate fruits. **Mycopathologia**. Den Haag, v. 157, n. 2, 2004.

LIU et al. New records of *Kazachstania* species in Taiwan. **Taiwania**. Taipei, n. 53, v. 3, p. 293-300, 2008.

LUNA, J. M. DE; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Braz. Arch. Biol. Technol.** Curitiba, v.52, n.4, 2009.

MACHADO, A.P.S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água.** Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente Escola de Engenharia da Universidade do Minho. Departamento em Engenharia Biológica, 2006. 116f.

MASON, P.G.; HUBER, J.T. **Biological Control Programs in Canada 1981-2000.** CAB International, CABI Publishing, 2000. 568 p.

MASOUD, W.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast.** Chichester, v. 21, n. 7, p. 549-56, 2004.

MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T.; WETZEL, M.M.V.S. Coleções de culturas microbianas no Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária. **Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 102, 2003. 41p.

MEYER et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** Washington, nº 31, p. 2274-2280, 1993.

MUNK, A. *Coniochaeta pulveracea*. **Dan. bot. Arkiv.** Kobenhavn, v.12, n. 11, p. 9, 1948.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGICAL INFORMATION. Disponível em : <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 02 abr. 2010.

ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. **Smith's Introduction to Industrial Mycology.** 7 ed. Edward Arnold Publishers Ltda. Avon. 1981. 398 p.

PARK, D. On the ecology of heterotrophic micro-organisms in freshwater. **Transactions of the British Mycological Society,** Oxford, v.58, n.2, p.291-299, 1972.

PENDLE, S. et al. Phaeohyphomycotic soft tissue infections caused by the coelomycetous fungus *Microspheeropsis arundinis*. **J. Clin. Microbiol.** Washington, n. 42, vol. 11, p. 5315-5319, 2004.

PHILLIPS, R. **Mushrooms and other fungi of Great Britain and Europe**. London: Macmillan Reference, 1994. 288p.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorph states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press Inc. 1979. 633p.

ROCHA, M.; ZOTTARELI, C. L. A. P. Chytridiomycota e oomycota da represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Acta Bot. Bras.** Porto Alegre, v.16, n.3, p. 287-309, 2002.

RODRIGUES, E. M.; MILAGRES, A. M. F.; PESSOA JR., A. Selective recovery of xylanase from *Penicillium janthinellum* using BDBAC reversed micelles. **Acta Biotechnol.** Berlin, v. 19, n. 2, 157-161, 2004.

ROJAS, N.L. et al. Role of PPase-SE in *Geotrichum klebahnii*, a yeast-like fungus able to solubilize pectin. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.11, n.1, 2008. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue1/full/13/>>. Acesso em: 02 abr. 2010.

ROSSMAN, A.Y. et al. The coelomycetous genera *Chaetomella* and *Pilidium* represent a newly discovered lineage of inoperculate discomycetes. **Mycological Progress**. Tübingen, n. 3, v. 4, p. 275-290, 2004.

ROYER, J.C.; NAKAS, J.P. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. **Enzyme Microb. Technol.** New York, 1989, v. 11, n. 7, p. 405-410.

RUEGGER M. J. S., TAUKE-TORNISIELO S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Bot.** São Paulo, v. 7, n. 2, p. 205-211, 2004.

SACCARDO, P.A. **Atti Soc. Veneto-Trent. Sci. Nat.** Padova, v. 4, n. 80, 1875.

SAMPAIO et al. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Reading, n° 51, p. 687-697, 2001.

SAMSON, R.A. FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and extrolites. **Stud. Mycol.** Utrecht, v. 49, p. 1-260, 2004.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food- and airborne fungi**. 7 Ed. Wageningen: Ponsen & Looyen. 2004. 389p.

- SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Stud. Mycol.** Baarn, n.6, p. 1-119, 1974.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotech. Adv.** New York, n. 27, p. 185-194, 2009.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. et al. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.32, p. 61-65, 2001.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. et al. Microscopic fungi in the atlantic rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.37, p. 267-275, 2006.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; GRANDI, R.A.P. The diversity of aquatic hyphomycetes in South America. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.34, p. 183-193, 2003.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; MILANEZ, A. I. Amostragem em limnologia: os fungos aquáticos. In: BICUDO, C. E. M.; BICUDO, D. C. (eds.). **Amostragem em limnologia.** São Carlos: RiMa, 2004, p. 179-191.
- SHIVAM, K.; TRIPATHI, C. P. M.; MISHRA, S. K. Culture conditions for the production of  $\alpha$ -galactosidase by *Aspergillus parasiticus* MTCC-2796: a novel source. **Electronic Journal of Biotechnology.** Valparaíso, v.12, n.4, p. 1-9, 2009. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol12/issue4/full/8/8.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2010.
- SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation.** New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 592p. 2006.
- SOUZA, H.Q.; AGUIAR, I.J.A. Diversidade de Agaricales (Basidiomycota) na Reserva Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.** Manaus, v.34, n.1, p.43-51, 2004.
- SPECIES 2000. Disponível em: <[http://www.sp2000.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=12&Itemid=26](http://www.sp2000.org/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=26)>. Acesso em: 21 set. 2009.
- SUH, S.O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycol. Res.** Cambridge, v. 109, n. 3, p. 261-265, 2005.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and Stromata.** Survey: Commonwealth Agricultural Bureaux. 1980. 696p.

TAKAHASHI, J.P. **Diversidade de geofungos em águas do Parque Municipal do Ibirapuera na cidade de São Paulo, SP, Brasil.** 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia.** 8 ed. Revisão técnica de: M. H. Vainstein; A. Schrank. Porto Alegre: Artmed, 2007, 894 p.

UIJTHOF, J.M.J. **Taxonomy and phylogeny of the human pathogenic black yeast genus *Exophiala Carmichael*.** Academic Proefschrift. Wageningen: Ponsen & Looijen. 1996. 120p.

VASCONCELOS, W.E. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.** V. 3, n. 2, 2003. Disponível em: < <http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/fungos.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

VERA, E. H. Hongos Patogenos o Potencialmente Patogenos De Los Balnearios Del Oeste De Puerto Rico. **Carib. J. Sci.** Mayaguez, v.15, p. 1-2, 1975.

VILELA, R. et al. **Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*.** (2005). Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1233932&blobtype=pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2009.

VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.33, p. 230-235, 2002.

WAINWRIGHT, M. Novel uses for fungi in biotechnology. **Chem. Ind.** London, v. 2, p. 31-34, 1990.

WEBSTER, J. **Introduction to fungi.** 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 669p.

WELLBAUM, C. et al. Fungos filamentosos em folhas do ambiente terrestre e aquático da Ilha dos Eucaliptos, Represa do Guarapiranga, São Paulo, SP. **Rev. Bras. Bot.** São Paulo, v.22, n.1, p.69-74, 1999.



WFCC – WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS. **Guidelines for establishment and operation for of collections of cultures of microorganisms**. 2<sup>a</sup>. ed. 1999. Disponível em: <<http://www.wfcc.info/GuideFinal.html>>. Acesso em: 21 set. 2009.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Comp.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WINGFIELD, M.J. ; KENDRICK, W.B.; VAN WYK, P.S. Analysis of conidium ontogeny in anamorphs of *Ophiostoma*: *Pesotum* and *Phialographium* are synonyms of *Graphium*. **Mycol. Res.** Cambridge, n.95, p. 1328–1333, 1991.

ZALDÍVAR, M. et al. *Trichoderma aureoviride*, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 4, n. 3, p. 97-121, 2001.

## APÊNDICE

### Resultados do teste MANOVA realizado no *software* SAS 9.1.3

Teste	Valor	Valor F	Num DF	Den DF	Pr > F
<b>Wilks' Lambda</b>	0,00370985	12,62	102	770,93	<b>&lt; .0001</b>
<b>Pillai's Trace</b>	2,57608109	6,15	102	834	<b>&lt; .0001</b>
<b>Hotelling-Lawley Trace</b>	20,27978702	26,34	102	553,56	<b>&lt; .0001</b>
<b>Roy's Greatest Root</b>	11,78925311	96,39	17	139	<b>&lt; .0001</b>

### Análises de correlações canônicas geradas no SAS 9.1.3

Os valores em destaque correspondem àqueles que foram considerados para interpretação da análise estatística. A análise simulou quatro situações em cada ponto, de modo que as relações ocorreram entre as variáveis abióticas com as bióticas, sendo sempre V1xW1 (amarelo), V2xW2 (azul), V3xW3 (verde) e V4xW4 (rosa).

#### PONTO 1

Ponto 1 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 1 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,2579	-0,0147	-0,3557	0,2728	Fungos	0,5637	0,0021	-0,5696	0,5982
Pluv	0,2042	-0,2398	0,0859	-0,1176					
pH	0,0312	-0,0521	0,0183	-0,1044	Leveduras	-0,1931	0,4266	-0,7591	0,4522
Cond	0,0355	-0,0197	0,0879	-0,2055					
Temp	0,5393	0,0222	-0,1135	-0,0533					
SolT	0,6408	0,2004	0,0325	-0,0665					
Turb	0,3401	0,1176	-0,0418	-0,2589					
Oxig	0,0251	0,2625	0,4490	-0,3397					
DBO	0,3102	0,0825	0,0269	0,6890					
Cloretos	-0,1887	-0,2970	-0,1048	-0,1756					
NitrT	-0,6204	-0,0491	-0,0523	-0,3503					
IonP	0,2185	-0,1085	0,0299	-0,3091					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 2

Ponto 2 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 2 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,4940	0,0183	-0,0997	0,5414	Fungos	0,5675	0,5504	0,7312	0,5596
Pluv	0,5223	0,0631	-0,1488	0,3035					
pH	-0,0281	-0,2056	-0,0365	0,3307	Leveduras	0,4983	-0,4718	-0,4445	0,5758
Cond	-0,4306	-0,1066	-0,2697	-0,5735					
Temp	0,1324	0,2616	-0,2708	0,1045					
SolT	-0,6220	0,0215	0,1439	-0,2211					
Turb	0,3471	-0,2194	0,3671	0,2062					
Oxig	-0,3483	-0,3337	0,0869	-0,0833					
DBO	-0,4394	0,0528	-0,2197	-0,3859					
Cloretos	-0,3924	-0,1282	-0,2017	-0,4781					
NitrT	-0,4023	0,2852	0,0757	-0,4312					
IonP	-0,3135	-0,1189	-0,0078	0,1228					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 3

Ponto 3 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 3 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,4407	-0,1210	0,1650	0,1919	Fungos	0,9207	0,0187	0,6993	0,6443
Pluv	0,3525	0,0333	0,1490	0,4076					
pH	-0,0105	-0,1558	0,1489	0,0577	Leveduras	0,3622	-0,7970	-0,6097	0,3615
Cond	-0,6803	-0,2384	-0,2408	-0,2016					
Temp	-0,2685	-0,4349	0,3356	0,1260					
SolT	-0,6005	-0,1301	0,0287	0,1925					
Turb	0,6038	0,3989	-0,4429	0,0773					
Oxig	-0,2936	-0,0123	-0,4082	-0,3611					
DBO	-0,2084	0,4053	0,0481	-0,5129					
Cloretos	-0,5209	-0,1303	-0,1011	-0,3549					
NitrT	-0,6973	0,0883	0,1065	-0,2745					
IonP	-0,1847	-0,6902	-0,5384	-0,2640					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 4

Ponto 4 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 4 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,3763	0,0799	0,0925	0,4640	Fungos	0,9423	-0,2734	0,6850	-0,1914
Pluv	0,5183	0,0711	0,1849	0,2279					
pH	-0,3509	-0,1051	-0,1170	-0,0790	Leveduras	0,7943	-0,0155	-0,2150	0,9744
Cond	-0,5405	0,1656	-0,2596	-0,4212					
Temp	-0,1238	0,3314	0,3994	0,0042					
SolT	0,6215	0,5417	0,1805	0,3236					
Turb	0,9713	0,1295	0,1710	0,0267					
Oxig	-0,0982	-0,3796	0,2657	-0,1375					
DBO	-0,1975	0,0577	0,5809	-0,2241					
Cloretos	-0,3122	0,0867	-0,2522	-0,2340					
NitrT	-0,5977	0,1980	-0,3951	-0,5112					
IonP	0,0471	0,0429	-0,0132	-0,2013					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 5

Ponto 5 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 5 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,6210	-0,0049	0,2469	0,0523	Fungos	0,8876	0,3421	-0,2022	-0,2331
Pluv	0,5892	0,1253	0,3503	-0,3023					
pH	-0,1344	0,1081	0,2024	-0,1079	Leveduras	0,5722	-0,5411	0,5275	-0,3187
Cond	-0,7353	-0,0373	0,0530	0,1083					
Temp	0,2215	0,2139	0,3666	-0,0229					
SolT	0,2761	-0,3724	-0,3552	0,1314					
Turb	0,9088	0,1890	0,2255	0,1400					
Oxig	0,2697	0,4919	-0,5335	-0,4241					
DBO	0,0864	0,1368	-0,5720	0,0063					
Cloretos	-0,6386	-0,0003	-0,0442	0,3950					
NitrT	-0,8551	-0,1134	0,0466	0,2743					
IonP	-0,6901	0,2480	0,1098	0,2929					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 6

Ponto 6 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 6 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,5537	0,2976	0,5917	0,0458	Fungos	0,8421	0,6161	0,4926	0,4560
Pluv	0,6702	0,1117	0,4502	0,2225					
pH	0,0076	0,0311	-0,1547	0,1860	Leveduras	-0,5248	0,6431	0,6349	0,6366
Cond	-0,6063	-0,0276	-0,2432	-0,1835	LevL				
Temp	0,3060	-0,2712	-0,1488	-0,1594					
SolT	-0,5780	0,2021	0,1379	0,1183					
Turb	0,2544	0,0464	0,5281	0,4069					
Oxig	0,0969	-0,0450	0,2258	-0,0898					
DBO	-0,5970	-0,4433	-0,1884	-0,0216					
Cloretos	-0,6356	-0,0738	-0,1990	-0,1108					
NitrT	-0,5885	-0,1457	-0,1127	-0,3193					
IonP	-0,2814	0,2439	-0,1664	-0,5762					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

## PONTO 8

Ponto 8 – fatores abióticos	V1	V2	V3	V4	Ponto 8 – fatores bióticos	W1	W2	W3	W4
Est	0,3190	0,3095	0,1685	0,2246	Fungos	-0,5678	0,7699	0,0580	0,6968
Pluv	0,0034	0,4678	0,2684	0,1269					
pH	0,0874	-0,5425	0,0078	0,3746	Leveduras	0,5444	0,6343	-0,7537	0,0220
Cond	0,2145	-0,6505	-0,0306	-0,2973					
Temp	-0,0748	0,4072	0,3270	-0,6459					
SolT	0,1890	0,3854	-0,2054	0,1263					
Turb	0,1270	0,8075	0,3107	0,4035					
Oxig	-0,5718	-0,0729	0,4619	-0,0309					
DBO	-0,0690	0,0550	-0,3888	0,5411					
Cloretos	0,0001	-0,5232	-0,1839	-0,2807					
NitrT	0,4108	-0,7160	-0,1191	-0,2929					
IonP	0,2716	-0,2820	0,1757	0,2117					

**Legenda:** **Est:** Estação (seca ou chuvosa); **Pluv:** Pluviosidade; **pH:** Potencial hidrogeniônico; **Cond:** Condutividade elétrica; **Temp:** Temperatura da água; **SolT:** Sólidos totais; **Turb:** Turbidez; **Oxig:** Oxigênio dissolvido; **DBO:** Demanda bioquímica de oxigênio; **Cloretos:** Cloretos; **NitrT:** Nitrogênio total; **IonP:** Íons P (fósforo); **Fungos:** UFC de Fungos filamentosos; **Leveduras:** UFC de Leveduras.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)