



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**CARACTERIZAÇÃO QUANTO A FATORES DE
PATOGENICIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS
ISOLADOS DA PRAIA DE CANDEIAS, JABOATÃO DOS
GUARARAPES, PE.**

RECIFE

2005

LUCIANA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUANTO A FATORES DE PATOGENICIDADE
DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA PRAIA DE
CANDEIAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PE.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos da
Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Mestre.

ORIENTADORA: Dra. MARIA AUXILIADORA DE QUEIROZ CAVALCANTI.

CO-ORIENTADOR: Dr. JOSÉ ZANON DE OLIVEIRA PASSAVANTE.

**RECIFE
2005**

Oliveira, Luciana Gonçalves de

Caracterização quanto a fatores de patogenicidade de fungos filamentosos isolados da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE. – Recife : O Autor, 2005.

52 folhas : il., tab., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Micologia – Biologia de fungos. 2. Fungos filamentosos – Ecologia e taxonomia – Fatores de patogenicidade - Caracterização. 3. Protease.

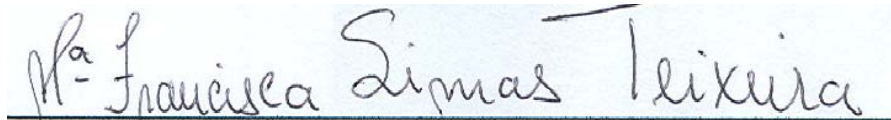
LUCIANA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUANTO A FATORES DE PATOGENICIDADE
DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA PRAIA DE
CANDEIAS, JABOATÃO DOS GUARARAPES, PE.**

Dissertação aprovada e defendida pela banca examinadora em 18/03/05



DRA. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Orientadora (Departamento de Micologia/ UFPE)



DRA. Maria Francisca Simas Teixeira
(Departamento de Parasitologia/ UFAM)



DRA. Norma Buarque de Gusmão
(Departamento de Antibióticos/ UFPE)

Recife

2005

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

À Coordenação do Programa de Pós - Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, nas pessoas da Dra. Neiva Tinti de Oliveira e Dra. Leonor Costa Maia, pelo apoio sempre prestado.

A minha orientadora Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela valiosa orientação, dedicação e incentivo.

Ao meu co – orientador Dr. José Zanon de Oliveira Passavante pelo apoio, incentivo e presteza em todos os momentos.

As professoras Maria José dos Santos Fernandes, Débora Massa Lima e Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti pela identificação dos fungos.

Ao Corpo docente da Pós - Graduação em Biologia de Fungos pelos valiosos ensinamentos.

A André Santos pela ajuda na análise estatística.

A minha turma de mestrado, especialmente a minha amiga Adriana Lima pelo convívio e companheirismo.

A minha família em especial, pois sem ela eu nada seria.

Ao meu namorado e amigo Charles Henrique pelo convívio, companheirismo em todos os momentos.

Ao meu amigo Bruno Machado Leão em todos os momentos de amizade, principalmente pela ajuda durante as coletas.

A minha amiga Claudia Poliana por conceder condução para as coletas.

A minha grande amiga Michelle Rose por todos momentos convívio, muito obrigada.

À minha irmã Cristiane pela amizade em todos os momentos.

Aos meus amigos de graduação que durante todo esse tempo estiveram comigo nas pessoas de Lilianni Chans, Veralucia Barbosa, Poliana Falcão, Rafaella Brasil, Giani Cavalcanti.

Enfim a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

*Aos meus pais Cardoso e Fátima,
Dedico.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista parcial da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes ,PE.	29
Figura 2: Porcentagem de fungos isolados da água da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.	35
Figura 3: Porcentagem de fungos isolados do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.	35
Figura 4: Atividade proteolítica de <i>Cladosporium sphaerospermum</i> em 8 dias de crescimento em ágar caseína do leite.	40
Figura 5: Atividade fosfolipásica de <i>Myrothecium roridum</i> em 15 dias de crescimento em ágar Sabouraud + gema de ovo.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos isolados da água e do solo na praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE, durante os períodos chuvosos e de estiagem. 33

Tabela 2: Parâmetros hidrológicos e do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE. 36

Tabela 3: Fatores de patogenicidade de fungos filamentosos isolados da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE. 38

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISAO DE LITERATURA	14
2.1 Fungos em ambientes marinhos	14
2.2 Influência da temperatura no crescimento dos fungos	17
2.3 Aspectos gerais das enzimas	17
2.3.1 Fosfolipases	18
2.3.2 Proteases	19
2.4 Características de patogenicidade	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Área de estudo	23
3.1.1 Características da área de estudo	23
3.1.2 Coleta do solo e da água	23
3.2 Parâmetros hidrológicos e do solo da Praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE	24
3.3 Isolamento e purificação dos fungos	24
3.4 Meios de cultura utilizados	25
3.4.1 Para isolamento e purificação dos fungos	25
3.4.2 Para identificação	25
3.4.3 Para fatores de patogenicidade	26
3.5 Identificação dos fungos	27
3.6 Análise estatística	27
3.7 Detecção de características de patogenicidade	27

3.7.1 Crescimento a 37°C	27
3.7.2 Atividade fosfolipásica	28
3.7.3 Atividade proteásica	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Fungos isolados de ambiente marinho	30
4.2 Parâmetros hidrológicos e dados do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.	31
4.3 Caracterização quanto a fatores de patogenicidade	36
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

Os fungos compreendem um grupo de microrganismos sapróbios, cosmopolitas ou simbioses importantes componentes dos ecossistemas, constituindo o maior grupo de microrganismo responsável pela produção de enzimas. Considerando a escassez de trabalhos que tratam da micota filamentosa em ambientes marinhos, este trabalho teve como objetivos isolar, identificar e caracterizar quanto a fatores de patogenicidade fungos filamentosos do solo e da água da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE. Foram realizadas quatro coletas de solo e de água, durante os períodos chuvosos e de estiagem, em três pontos aleatórios ao longo da praia, durante a baixa-mar do dia. De cada amostra de solo foi feita uma suspensão de 50g de solo em 90ml de água destilada esterilizada. Desta, foi semeado 0,5ml na superfície de Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100mg/L) em placas de Petri. Da água, 0,5 ml foi semeado em placas de Petri, nas mesmas condições das utilizadas para o solo. Foram isoladas 57 espécies correspondentes a 19 gêneros de fungos filamentosos. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais representativos tanto no solo como na água. Foram testadas 54 espécies de fungos quanto aos fatores de patogenicidade: crescimento a 37°C, atividades proteásica e fosfolipásica, das quais, *Aspergillus carbonarius*, *A. flavipes*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium corylophilum*, *P.citrinum*, *P. purpurogenum*, *P. solitum*, *Talaromyces wortmanii*, *Phoma capitulum* apresentaram positividade para os três parâmetros utilizados.

ABSTRACT

The molds include an heterogeneous group of heterotrophical saprophytes, cosmopolitan and symbiosis microorganisms very important component in the ecosystems, constituting the greatest group of microorganisms responsible for the enzyme production. There are few works about filamentous fungi in marine environment. This research has main objective to isolate, to identify and characterize the fungi of soil and water in Candeias Beach, Jaboatão dos Guararapes, PE. Four collects of soil and water had been done, during the winter and summer, in three localities in the beach, on the low tide. All samples soil was done with 50g de soil in the 90ml of water. Of sterilized distilled water, and for each one, soil and water, it was removed 0,5ml to seed, three times, on Petri's plate with Sabouraud agar and cloranphenicol . They were identified 57 species classified in 19 genus. *Aspergillus* and *Penicillium* were the most found on the soil and water. They were tested 54 species by pathogenity factors, like: grown at 37°C, proteolytic and phospholipase activity, among *Aspergillus carbonarius*, *A. flavipes*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium corylophilum*, *P.citrinum*, *P. purpurogenum*, *P. solitum*, *Talaromyces wortmanii*, *Phoma capitulum* have presented all three characteristics of pathogenity.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo de microrganismos heterotróficos, atuando como sapróbios ou parasitas, menos freqüentes como simbioses, vivendo em associação com outros organismos (DIX & WEBSTER, 1995). Estes microrganismos são importantes componentes dos ecossistemas, nutrindo-se de matéria orgânica em decomposição, sendo imprescindíveis na reciclagem de minerais e do Ciclo do carbono, tanto no solo quanto na água (HOGG; HUDSON, 1966; HARLEY, 1971, TRISKA et al., 1975; SUBERKROPP; KLUG, 1976; MOORE-LANDECKER, 1996).

Diferentes grupos de fungos são encontrados na água, como Zygomycetes, Ascomycetes, Coelomycetes, Hyphomycetes, raros Basidiomycetes, bem como os autênticos fungos zoospóricos (HYDE, 1997); entretanto, o conhecimento sobre a micota filamentosa do solo e da água em ambientes marinhos é escasso. Entre os trabalhos existentes sobre o assunto, destacam-se os de Dabrowa et al. (1964), Kishimoto; Backer (1969), Bergen; Wagner-Merner (1977); Kirk (1983); Udagawa; Ueda (1985); Tan (1985); Purchio *et al.* (1988), Pinto et al. (1992) e Sarquis (1993).

Em comparação com as milhares de espécies fúngicas conhecidas em ambientes terrestres, apenas 500 foram descritas em oceanos e estuários (KOHLMEYER; KOHLMEYER, 1979; KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER, 1991).

Os oceanos são conhecidos por conter uma ampla variedade de fungos, inclusive os fungos patógenos ao homem. Entretanto, os oceanos como possível fonte de fungos patógenos ao homem tem recebido pouca atenção (DRABOWA et al., 1964).

Infecções de etiologia fúngica em humanos são freqüentemente observadas durante estações do ano em que a temperatura ambiental e a umidade relativa são altas, além da areia de praia representar um importante papel como veículo na transmissão de processos de infecção (LARRONDO; CALVO, 1989).

Fungos patógenos existentes em ambientes marinhos são dependentes de fatores ambientais, especialmente pH, temperatura, salinidade da água do mar, antagonismo microbiano e interações entre esses fatores (ANDERSON, 1979b).

A habilidade de alguns fungos causar doenças em animais, e particularmente em humanos, parece estar relacionado com alguma característica peculiar de seu metabolismo não compartilhada por espécies taxonomicamente correlatas. Dentre as milhares espécies de fungos, apenas 100 são consideradas patogênicas para humanos. A principal razão para a patogenicidade dos fungos pode ser expressa em termos gerais pela tolerância do fungo a temperatura de 35 - 37° C, possuir um sistema enzimático que permita o parasitismo em tecidos animais e circunstâncias que exponham o hospedeiro aos esporos do fungo (SAN-BLAS, 1982).

Os fungos patógenos secretam várias enzimas hidrolíticas tais como protease e fosfolipase. Enzimas hidrolíticas secretadas extracelularmente podem representar uma parte na infecção causando dano à célula hospedeira (TAKAHASHI et al., 1991). Dentre os principais fungos responsáveis pela produção de enzimas, destaca-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* (GRAY, 1959; UNDERKOFER, 1976; LOWE, 1992).

A maior parte dos trabalhos que tratam da micota filamentosa de ambientes marinhos está centralizada nos países da Europa e América do Norte e poucos disponíveis nos trópicos. Por isso, existe grande interesse de ampliar os conhecimentos sobre a diversidade de fungos em ambientes marinhos, ressaltando os de patogenicidade das espécies isoladas, tema pouco explorado no Brasil.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1 Fungos em ambientes marinhos

O estudo de Johnson; Sparrow em 1961 (citado por PURCHIO et al., 1988) intitulado “Fungos em oceanos” foi considerado como marco inicial da Era da Micologia Marinha. Estes autores confirmaram que os conhecimentos de fungos marinhos eram tão incipientes quando comparado com àqueles do solo, ressaltando que o desconhecimento destes microrganismos, como parte da comunidade marinha apresenta uma grande contribuição.

A distribuição geográfica dos fungos em ambientes marinhos está dividida em cinco zonas litorais: ártica, temperada, subtropical, tropical e antártica (HUGHES, 1974).

Hughes (apud BOOTH, 1979) revisou trabalhos feitos desde o aparecimento do tratado e sugere que áreas estão se dividindo em ambiente e ecologia do substrato, e a biogeografia do fungo em marés de águas do hemisfério norte e sul. Jones (apud BOOTH, 1979) amplia estas áreas propondo pesquisas com fungos em sedimentos marinhos, doenças de fungos em peixe, produção de proteínas fúngica em hidrocarboneto e produtos residuais, pesquisa para produção de metabólitos secundários e aspecto para liberação de esporo.

Abdel-Fattah et al. (1977) identificaram 34 gêneros e 92 espécies e duas variedades de *Aspergillus nidulans*, isolados de 74 amostras de solo coletados de diferentes locais de pântano salgado no Egito. *Aspergillus* e *Penicillium* foram os de maior ocorrência, enquanto *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Mucor* e *Rhizopus* tiveram menor ocorrência. Estes autores concluíram que os solos de pântano salgado foram relativamente pobres em número de espécies de fungos, e que depois da observação da análise físico – química, a contagem total de fungos isolados foi afetada pelo teor de sais solúveis como sódio e potássio e não pelo teor de matéria orgânica.

Dabrowa et al. (1964) fizeram um levantamento para determinar a presença de fungos potencialmente patogênicos ao homem na zona intertidal de praias da Califórnia (EUA). Dentre os resultados encontrados, das amostras de solo, de algas, de animais marinhos e de penas de pássaro, foram isolados 30 espécies de fungos patógenos ao

homem. Os considerados potencialmente patogênicos foram *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *Hormodendrum compactum*, *Monosporium apiospermum*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *Sporotrichum schenckii*. *Absidia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* foram consideradas com menor potencial de patogenicidade. Esses autores sugeriram que a zona intertidal pode constituir um reservatório adicional de fungos potencialmente patogênicos e que certas infecções fúngicas podem ser adquiridas pela exposição de banhistas nessas áreas.

Kishimoto; Baker (1969) isolaram 10 gêneros distribuídos em 13 espécies de fungos patógenos ou potencialmente patógenos isolados da areia de praia no Havaí. Dentre elas destacaram-se: *Candida albicans*, *Cladosporium werneckii*, *Epidermophyton floccosum*, *Geotrichum candidum*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *Trichosporon cutaneum*. Foi observado nesse trabalho que a maioria de fungos patógenos ou potencialmente patógeno foram isolados de áreas onde a havia densidade alta de banhistas e, inversamente poucos foram isolados onde a densidade de banhistas era baixa.

Pinto et al. (1992) estudaram a micota do solo e da água da praia de Boa Viagem (PE), onde foram identificadas 65 espécies. Dentre as isoladas do solo, *Aspergillus* predominou com 19 espécies, seguido de *Penicillium* (17), *Phoma* (5), *Trichoderma* (4), *Cladosporium* e *Fusarium* (3), *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Dreschlera*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Periconia* e *Pithomyces* (2). Resultados semelhantes foram observados da micota isolada e identificada da água em que *Aspergillus* e *Penicillium* predominaram com 20 e 19 espécies, respectivamente.

Hughes (1968) em seu trabalho de fungos lignícolas interdital de Newfoundland isolou 18 espécies de fungos lignícolas dentre elas 11 foram Ascomycetes: *Amylocarpus encephaloides*, *Ceriosporopsis cambrensis*, *Corollospora cristata*, *C. trifurcata*, *Halosphaeria appendiculata*, *H. tubulifera*, *Lindra inflata*, *Lulworthia medusa*, *Remispora maritima*, *R. pilliata* e *R. stellata*; um Basidiomycete: *Digitatispora marina*; e seis Deuteromycetes: *Arthrobotrys superba*, *Humicola alopallonella*, *Monodictys pelagica*, *Zalerion maritimum*, *Z. varium* e *Phoma* sp.

Trabalhos em micologia marinha foram estimulados pelo artigo em que Barghoorn e Linder (1944) os quais descreveram 25 espécies de Ascomycotina e Deuteromycotina marinhos. Entretanto, a maioria dos trabalhos tem sido realizado em países temperados. Somente nos recentes anos mais atenção foi direcionada para investigações nos trópicos. De acordo com Leong et al. (1988) no Sudeste Asiático alguns estudos foram feitos por Vrijmoed et al. (1982, 1986, Hong Kong), Suhirman; Jones (1983, Indonésia), Gacutan; Uyenco (1983, Filipinas), Kohlmeyer (1984) e Koch (1986, Tailândia). Estes autores relataram 28 espécies de fungos marinhos lignícolas de água costal em Hong Kong, 23 espécies na Indonésia, 21 na Tailândia e 7 espécies nas Filipinas.

Segundo Sundari (1996) fungos em ambientes marinhos têm sido objetivo de interesse nas duas últimas décadas. Relatos iniciais de fungos marinhos tropicais foram feitos no Oceano Atlântico, acompanhado por trabalhos no Oceano Pacífico, enquanto que recentemente tem sido relatado no Oceano Índico.

Poucos dados existem na distribuição geográfica da micota marinha no Oceano Pacífico Central, exceto para coleções feitas no Arquipélago Havaiano. O estudo de fungos marinhos neste local pode contribuir para o conhecimento de sua dispersão e imigração (VOLKMANN-KOHLMEYER; KOHLMEYER, 1993).

Kohlmeyer (1981) em breve visita a Martinique (Antilha Francesa) listou 20 espécies de fungos filamentosos sendo duas novas ocorrências para a ilha. Dentre as identificadas destacaram-se: *Bathyascus tropicalis*, *Ceriosporopsis capillaceae*, *Corollospora maritima*, *C. trifurcata*, *Dactylospora haliotrepha*, *Didymosphaeria enalia*, *Halosphaeria quadricornuta*, *H. salina*, *Leptosphaeria australiensis*, *L. aviceuniae*, *Lignicola laevis*, *Lindra thalassiae*, *Lulworthia* sp, *Remispora crista* e *Torpedospora radiata* foram os Ascomycetes; *Nia vibrissa* (Basidiomycete); e, *Cytospora rhizophorae*, *Periconia prolifica* e *Varicosporina ramulosa* (Deuteromycetes).

Wagner-Merner (1972) relata que a ocorrência e distribuição de fungos arenícolas da Costa Sul e Central da Flórida foi estudada pela amostragem periódica da espuma do mar de quatro Praias de Gulf. O autor concluiu que os esporos ocorrem e sua distribuição e diversidade pode ser influenciada pela localização da praia ao pântano e dos manguezais aos estuários, mas o papel dos fungos na espuma do mar é discutido.

Segundo Tan; Lim (1983) estudos têm demonstrado que a ocorrência e a distribuição de fungos aquáticos e geofungos em riachos são afetadas pela poluição da água. Estes pesquisadores isolaram 35 espécies representadas por 20 gêneros em águas límpidas e poluídas em Singapura.

De acordo com Hyde (1989) estudos ecológicos quantitativos em fungos marinhos de habitat tropical específicos têm sido estudado por Hyde (1986); Jones; Tan (1987) e Jones et al. (1988). Hyde (1986) investigou fungos marinhos tropicais de cinco localidades de Seychelles. Dois locais de manguezal e três de praia foram estudados, além de observações a respeito da ecologia da micota. Jones; Tan (1987) e Jones et al. (1988) divulgaram mapas de ocorrências de fungos em mangues na Malásia e Filipinas.

Tubaki et al. (1993) estudaram Hyphomycetes aquáticos em Singapura onde as espécies foram identificadas com base no detalhe do conídio ou de culturas obtidas. Dentre os fungos isolados, foram identificadas *Angulospora aquatica*, *Beltrania rhombica*, *Campylospora parvula*, *Condylospora spumigena*, *Culicidospora* sp, *Helicosporium* sp, *Ingoldiella hamata*, *Scutisporus brunneus*, *Scutisporus* sp, *Tricladium* sp, *Tripospermum camelopardus*, *Triscelophorus acuminatus* e *Trichocladium singaporense*.

Schoenlein-Crusius; Grandi (2003) procederam a um levantamento da diversidade de Hyphomycetes aquáticos na América do Sul onde cerca de 90 espécies foram mencionadas para Argentina, Brasil, Chile, Equador, Peru e Venezuela.

2.2 Influência da temperatura no crescimento dos fungos

Grande quantidade de espécies fúngicas pode crescer a temperaturas que variam desde um pouco acima de zero grau até 40-50°C. Assim, os fungos se classificam, quanto à temperatura, em três grandes grupos: os fungos psicrófilos, que crescem em temperatura 0° C a 20° C, os mesofílicos, que crescem em temperatura de 5°C a 35°C, com temperatura ótima entre 20 e 25°C, dependendo da espécie, e os termófilos, de 40° a 50°C (SIDRIM; MOREIRA, 1999; DIX; WEBSTER, 1995). Há ainda aqueles chamados termófilos extremo que crescem a uma temperatura de 90° C a 110°C, com temperatura ótima de crescimento a 105°C, não crescendo abaixo de 85°C (ATTLAS; BARTHA, 1992).

Entre os fungos termófilos isolados de ambiente marinho podem ser citados: *Acremonium rutilu*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. terreus*, *A. wentii*, *Chaetomium globosum*, *Cunninghamella elegans*, *Curvularia palescens*, *Emericella nidulans*, *E. nivea*, *Monolia sitophila*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium corylophilum*, *P. glabrum*, *P. herquei*, *P. janthinellum*, *P. miczynski*, *P. minioluteum*, *P. pinophilum*, *P. restrictum*, *P. varians*, *P. waksmani*, *Stillbella clavispora* e *Trichoderma pseudokoningi* (GOMES,2002).

2.3 Aspectos Gerais das Enzimas

A maior variedade e mais especializada das proteínas são aquelas com atividade catalítica - as enzimas. Todas as reações químicas de biomoléculas orgânicas nas células são catalisadas pelas enzimas. Existem diferentes enzimas cada uma capaz de catalisar um diferente tipo de reação química (ALBERT et al., 1997; LEHNINGER et al.,1993).

As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todo organismo vivo e têm um importante papel na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro, além de atuar no controle de processos biogeoquímicos de células vivas. As enzimas podem também ser isoladas de animais, plantas e microrganismos. Estes últimos são considerados boas fontes de enzimas industriais devido a grande diversidade de enzimas que tem sido encontrado (ALVES et al., 2002).

Enzimas são importantes tanto para fungos patógenos quanto sapróbios na resistência do hospedeiro ou na utilização de matéria orgânica ou inorgânica do ambiente (CHANG et al. 1992). A utilização de meio sólido para selecionar amostras de fungos produtores de enzimas permite um rápido “screening” de fungos produtores ou não de enzimas específicas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.3.1 Fosfolipases

Fosfolipídios, comumente encontrados em todos animais, plantas e células microbianas, são mais freqüentes encontrados nas membranas celulares e vesículas do limite das membranas, possuindo uma enorme parte na sua estrutura e função.

A fosfolipase, enzima hidrolítica que hidrolisa os fosfolipídios, são classificadas em fosfolipase A, B, C e D dependendo do sítio de ação da enzima na molécula do substrato. Outra enzima envolvida na hidrólise do fosfolipídio é a lisofosfolipase, que hidrolisa os lisocompostos produzidos depois da atividade fosfolipase A pela remoção do grupo acyl (PRICE; CAWSON, 1977).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção, variando conforme o microrganismo. Essa enzima, localizada na superfície das leveduras e na extremidade do tubo germinativo, atua pela hidrólise dos fosfolipídios, dando origem aos lisofosfolipídios que causam dano à célula epitelial (OLIVERIA et al, 1998).

2.3.2 Proteases

Em grande parte, as células são constituídas de proteínas, as quais integram mais da metade de seus pesos secos. Proteínas determinam a forma e a estrutura de uma célula, e também são os principais instrumentos de reconhecimento molecular e catálise (ALBERT et al., 1997; LEHNINGER et al.1993).

Muitas espécies de fungos patógenos humanos secretam proteases *in vitro* ou durante o processo de infecção. Elas são normalmente detectadas qualitativamente utilizando-se como substratos meio de cultura contendo hemoglobina, caseína, gelatina, indicando atividade proteolítica (MONOD et al., 2002; AUNSTRUP, 1974).

As proteases são fatores de virulência associados a diversas doenças causadas por microrganismos. Segundo CRUEGER; CRUEGER (1990), dentre as diversas formas de classificação das enzimas proteolíticas, estas são também classificadas considerando-se o pH ótimo de atividade em: a) proteases ácidas (enzimas que apresentam pH ótimo de 2-4); b) proteases neutras (possuem uma oscilação do pH de atividade bastante estreita e não são muito estáveis a altas temperaturas), e c) proteases alcalinas que apresentam pH ótimo de atividade entre 8-11, dependendo do microrganismo utilizado para sintetizá-la.

Entre as enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos, as proteases alcalinas e as elastases são responsáveis pela deterioração do tecido devido à degradação da elastina, colágeno e proteoglicanas. A identificação e caracterização das proteases são pré-

requisitos tanto para a compreensão do papel delas na patogênese das doenças infecciosas quanto na aplicação em biotecnologia. (VERMELHO et al., 1996).

2.4 Características de patogenicidade

O termo patogenicidade diz respeito a características de um parasita em invadir a célula do hospedeiro provocando alterações fisiológicas ou anatômicas. Esta capacidade varia consideravelmente a depender do grau de patogenicidade ou a habilidade de causar doença que recebe o nome de virulência, a qual é influenciada não apenas pelas propriedades inerentes ao patógeno, mas pela capacidade do hospedeiro em repelir a invasão, neutralizando o patógeno e evitando a doença (PELCZAR, 1981).

Os mecanismos de patogenicidade fúngica têm sido sujeitos a uma considerável investigação básica. As principais barreiras fisiológicas contra o crescimento dos fungos dentro dos tecidos são a temperatura e o potencial de redox. A maioria dos fungos é mesofílico, apresentando limite de crescimento ótimo, menor que a temperatura do corpo humano. De maneira similar, a maior parte dos fungos são sapróbios e suas vias enzimáticas funcionam com maior eficácia num potencial de óxido-redução de substratos não vivos do que nos estados relativamente menos elevados do tecido metabólico vivente (RIPPON, 1988).

De acordo com Shen et al. (2004) os fatores de patogenicidade incluem toxinas, proteínas e hidrolases agindo nos componentes celulares do hospedeiro. Estas incluem proteases e provavelmente fosfolipases que possuem capacidade de participar ativamente da invasão da célula hospedeira. Estudos em microscopia eletrônica revelam que estas enzimas estão significativamente envolvidas em processos de crescimento, especialmente na fase micelial e também na penetração através da membrana celular hospedeira (MAYSER et al, 1996).

Kué (1962) observou a produção de enzimas extracelulares de *Cladosporium curcumerinum* em plântulas concluindo que a capacidade da atividade proteolítica para induzir a separação e desorganização de células no local infectado. O autor sugere a importância das proteases na patogenicidade e que os constituintes da parede celular são modificados e desse modo mais fontes de carbono são disponibilizadas para o fungo.

Ahearn et al. (1968) testaram a atividade proteolítica de 70 espécies de fungos, incluindo espécies de *Aureobasidium*, *Cephalosporium*, *Endomycopsis*, *Kluyveromyces* e numerosos esporobolomycetes. Eles constataram que os organismos com maior atividade proteolítica foram observados em *Candida lipolytica*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida punicea* e espécies de *Cephalosporium*. Os autores ainda relatam que a condição ótima para expressão enzimática varia com os diferentes organismos.

Segundo Hube (1998) a atividade proteolítica de *Candida albicans* tem sido discutido como fator de virulência desde 1965 e que linhagens com alta atividade proteolítica mostraram ser mais virulenta, e aquelas com deficiência de protease foram menos patogênicas.

Cohen (1981) estudou 25 linhagens representadas por 21 espécies de *Aspergillus* quanto à habilidade de produzir protease pelo método do teste em placa. Dessas espécies a maioria foi capaz de produzir protease, tais como: *A. clavatus*, *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. ochaceus*, *A. oryzae*, *A. stramatoides*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. ustus* e *A. versicolor*.

Estudos com *Rhizopus oryzae* demonstraram que esse fungo secreta proteinases usadas para produção de tempero e, por analogia com outros fungos patógenos pode contribuir para a virulência do organismo (FARLEY; SULLIVAN, 1998).

Chaves et al. (2003) observaram as características de patogenicidade de leveduras de importância médica estocada na Coleção de Culturas Micoteca URM e provenientes de pacientes com AIDS do Hospital das Clínicas de Pernambuco onde concluíram que todas as amostras cresceram a 37° C e apresentaram atividade quantitativa de protease. Das 15 amostras preservadas em óleo mineral 13 apresentaram atividade fosfolipase positiva e duas fosfolipases negativas e das 15 isoladas com pacientes com AIDS, quatro apresentaram atividade fosfolipase positiva e 11 apresentaram atividade fosfolipase negativa.

Silva et al. (1999) avaliaram 19 amostras de fungos filamentosos isolados de aveia processada quanto a fatores de patogenicidade, utilizando como parâmetros o crescimento a 37°C, atividade fosfolipásica e ureásica. Os autores concluíram que *Sporotrix cianescens*, *Aspergillus niveus* e *Oidiodendron gryseum* apresentaram características de patogenicidade

nos três testes realizados, enquanto que, as demais apresentaram um ou dois dos parâmetros utilizados.

Pitt (1994) cita que a principal característica para espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* serem patogênicas para o homem e pássaros é a capacidade de crescer a temperatura corpórea.

Abdullah; Al-Bader (1990) estudando a micota de solos do Iraque observaram que *Malbranchea sulphurea*, *Rhizomucor miehei*, *Scitalidyum termophilum*, *Sporotrichum termophilum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Trichoderma* sp foram considerados fungos termofílicos, pois cresceram a uma temperatura ou acima de 50°C, enquanto, a maioria das espécies encontradas foi considerada termotolerantes com temperatura ótima entre 30 a 40°C.

Anderson (1979a) estudou a sobrevivência de quatro fungos patogênicos ao homem: *Trichophytum mentagrophytes*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida albicans* e *Microsporum gypseum* a diferentes temperaturas (25-35°C) e salinidade (6-50‰). O autor observou que todos, exceto *T. cutaneum*, cresceram a 35°C em condições experimentais por 52 semanas e concluiu mesmo com o nível de salinidade e temperatura acima do encontrado no habitat natural, esses fatores indicam que a água do mar pode ser um nicho ambiental para fungos potencialmente patogênicos.

A atividade fosfolipásica em *C. albicans* foi primeiro observado em meio de cultura contendo gema de ovo ou lecitina. A detecção quantitativa da atividade fosfolipásica em *C. albicans* tem sido descrita por vários pesquisadores e sua atividade pode está relacionada com a aderência celular (TAKAHASHI, 1991).

Vidotto et al. (1999) estudaram 113 linhagens de *Candida albicans* isoladas de pacientes com o vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) e 25 de indivíduos HIV-negativos, como controle. As linhagens de *C. albicans* foram isoladas de diferentes partes do corpo e testadas a correlação do tubo germinativo, produção de fosfolipase e produção de sorotipos. Não houve correlação entre a atividade fosfolipásica e a distribuição de sorotipo, mas houve correlação positiva entre tubo germinativo e atividade fosfolipásica dos isolados da cavidade oral. Esses autores concluíram que a correlação entre a atividade fosfolipásica e a produção de tubo germinativo em linhagens de *C. albicans* facilita a penetração através da mucosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

3.1.1 Característica da área de estudo

O município de Jaboatão dos Guararapes possui 234km², representando 10,64% da área da Região metropolitana do Recife. Tem por limite ao norte, os municípios de São Lourenço da Mata e Recife; ao sul, o Oceano Atlântico, as cidades do Cabo de Santo Agostinho e de Moreno. O município é drenado pelos Rios Capibaribe, Pirapama e Jaboatão, este último destaca-se pelo grau de poluição de suas águas. O Rio Jaboatão recebe poluição orgânica oriunda das usinas açucareiras que estão localizadas próximas à sua bacia, como também os esgotos das cidades, vilas e pólos industriais (CPRH, 1999; COELHO-SANTOS, 1993).

A praia de Candeias localiza-se entre os paralelos 8°13'29'' – 8° 13'29'' latitude sul e apresenta cerca de 4,2km de extensão. Caracteriza-se por não apresentar no mediolitoral formação de recifes que emergem a baixa-mar, sendo a zona intertidal atingida diretamente pelo impacto das ondas. No infralitoral há uma linha de recifes formada por algas calcárias mortas que emergem em marés extremamente baixas (COELHO-SANTOS, op cite) (Fig. 1).

Observa-se nessa área que durante o período de sizígia no período chuvoso, grande quantidade de algas vermelhas e pardas ocupando quase todo mediolitoral, produzindo um odor característico devido à liberação de gases provenientes de sua decomposição, além dessas algas são observados alguns microrganismos aquáticos e alguns representantes da fauna bentônica (COELHO-SANTOS, op cite).

3.1.2 Coleta do Solo e da Água

Amostras de solo foram coletadas, em três pontos aleatórios ao longo da praia, até 20cm de profundidade, durante os períodos estiagem e chuvoso, nos meses de janeiro e fevereiro e, junho e julho de 2004, respectivamente. As amostras do solo foram coletadas com auxílio de uma pá de jardinagem e acondicionadas em sacos plásticos.

As coletas da água foram realizadas a 1m de profundidade, em três pontos aleatórios ao longo da praia, de acordo com a baixa-mar do dia, sendo utilizados tubos de ensaio devidamente esterilizados e etiquetados. Igualmente amostras do solo, foram coletadas nos mesmos períodos. Foram medidos o pH, a temperatura e a salinidade da água e do solo. As amostras do solo e da água foram levadas ao laboratório, para o devido processamento.

3.2 Parâmetros hidrológicos e dados do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

As amostras do solo e água foram coletadas de acordo com a baixa-mar de Sízigia para o Porto do Recife em 2004. Foram determinados as salinidades da água e do solo com o refratômetro manual (HANNA), além do potencial hidrogeniônico (pH) utilizando o potenciômetro digital (HANNA) e a temperatura foi registrada com o termômetro digital (HANNA).

3.3 Isolamento e Purificação dos fungos

De cada amostra de solo, foi feita uma suspensão aquosa de 50g de solo diluído em 90ml de água destilada esterilizada (CLARK, 1965 modificado); 0,5ml da suspensão foi semeada na superfície de placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100mg/L), usando-se pipeta de 1ml, em triplicata. De cada amostra de água foi retirado 0,5ml para o semeio, na superfície de placas de Petri, em triplicata, contendo Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol.

Todas as placas foram incubadas a 28°C ($\pm$ 2°C) e a partir do aparecimento das primeiras colônias, as mesmas foram repicadas para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud com cloranfenicol (50mg/L).

Para purificação das amostras de fungos, fragmentos das colônias foram transferidos, separadamente, para placas de Petri, contendo Ágar Sabouraud + cloranfenicol; após confirmação da pureza, fragmentos foram inoculados em BDA, ágar Malte ou Czapeck contidos em tubos de ensaio.

3.4 Meios de culturas utilizados

3.4.1 Para Isolamento dos Fungos

- Ágar Sabouraud + Cloranfenicol (LACAZ et al., 1991)

Glicose.....40g,
Peptona de carne.....10g,
Ágar15g
Água destilada (q. s. p.)..... 1000ml.

3.4.2 Para Identificação

- Ágar Czapeck (LACAZ et al.,1991)

Sacarose30g
 NaNO_3 3g
 MgSO_4 0,5g
 KCl 0,5g
 $\text{FeSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g
 K_2HPO_4 1g
água destilada (q. s. p.)..... 1000ml.
pH :6,5

- Batata Dextrose Ágar (BDA) (LACAZ et al.,1991)

Batata inglesa..... 140g
Glicose20g
Ágar16g
Água destilada (q. s. p.)..... 1000ml.

- Ágar Malte (LACAZ et al. ,1991)

Extrato de malte..... 20g
Ágar16g

Água destilada (q.s.p.)..... 1000ml.

3.4.3 Para Fatores de Patogenicidade

- Caseína do leite (LACAZ et al.,1991)

Meio 1

Leite Desnatado.....10g

Água destilada (q.s.p.).....100ml

Meio 2

Agar2g

Água destilada (q.s.p.).....100ml

Os meios 1 e 2 foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 min. Após a esterilização, os mesmos foram esfriados a uma temperatura 45°C, misturados e vertidos em placas de Petri.

Empregou-se a solução acidificada de Cloreto de Mercúrio para distinguir a proteólise verdadeira (FRAZIER apud LACAZ et al, 1991).

Cloreto mercúrio.....12g

Acido clorídrico concentrado.....16ml

Agua destilada.....80ml

- Fosfolipase (PRICE et al., 1977, modificado)

Dextrose (Vetec).....40,0g

Peptona de Carne(Oxoid).....10,0g

Gema de ovo (*in natura*)..... 20,0g (2 gemas)

NaCl (Vetec).....58,5g

CaCl₂ (Vetec).....0,38g

Água destilada (q.s.p.).....1000 ml

pH : 5,7± 0,2 121°C; 15 min

Os ovos foram mergulhados numa solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) onde permaneceram submersos por um período de 3h. Em seguida utilizou-se um separador de gema, previamente esterilizado, para separação da clara e gema e sua película envoltória. As gemas foram incorporadas ao meio de cultura, previamente esterilizado e resfriado a uma temperatura de 45°C e homogeneizadas ao meio. Após a homogeneização o meio foi vertido em placas de Petri.

3.5 Identificação dos Fungos

Para identificação, as amostras de fungos purificadas foram transferidas para meios de cultura específicos (Ágar Czapeck, Batata-Dextrose-Ágar, Ágar Malte), sendo observadas características macroscópicas (coloração, diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas) seguindo Ellis (1971, 1976); Rapper & Fennell (1977); Carmichael et al. (1980); Domsch et al. (1993); Sutton (1980), Pitt (1988), entre outros, e quando necessário, utilizou-se a técnica de cultura em lâmina de Riddell (1950).

3.6 Análise estatística

A fim de comparar a influência da sazonalidade sobre a ocorrência de fungos filamentosos isolados do solo e da água foi utilizando a análise de variância dois fatores (ANOVA) utilizando o Software Systat.

3.7 Detecção de características de Patogenicidade

3.7.1 Crescimento a 37°C

Os fungos isolados da água e da areia da praia foram semeados, em duplicata, em tubos de ensaio contendo meios específicos. Um tubo foi mantido a temperatura ambiente

(TA $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) como controle e outro foi mantido a uma temperatura de 37°C em estufa, por um período de cinco dias.

3.7.2 Atividade fosfolipásica

Um inóculo de cultura jovem foi retirado e transferido para o centro da placa de Petri contendo meio para atividade fosfolipase. As culturas foram incubadas a T.A. ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo acompanhado até 15º dia de desenvolvimento. O diâmetro da colônia e o halo translúcido ao redor da colônia (caso ocorresse) foram medidos com uma régua milimetrada.

A atividade fosfolipásica foi medida em termos de diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação. Quando a zona de atividade (PZ) foi igual a 1, as amostras testadas eram fosfolipase-negativa, quando PZ foi menor que um demonstraram atividade positiva, utilizando a seguinte fórmula: $PZ = \frac{\text{Ø diâmetro da colônia}}{\text{Ø diâmetro da colônia} + \text{zona de precipitação}}$, onde PZ= atividade ; PZ=1 atividade negativa; PZ< atividade positiva e Ø= diâmetro da colônia; Zona de precipitação = halo formado.

3.7.3 Atividade proteásica

Inóculo de cultura jovem foi transferido para o centro de Placa de Petri contendo meio caseína, incubada a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), sendo acompanhada até o 8º dia. Quando evidenciado a formação de um halo hialino ao redor da colônia, foi considerado positivo para atividade proteásica, caso contrário, indicou ausência de atividade proteásica. Para se distinguir a hidrólise de caseína e produção de metabólitos ácidos e alcalinos contidos no leite, utilizou-se uma solução acidificada de cloreto de mercúrio na placa durante 10 minutos e após a retirada da solução, observou-se que caso diminuísse a área de clareamento, indicava que a caseína não foi digerida ou se visualizada a intensificação do halo transparente, significava que ocorreu proteólise verdadeira.



Figura 1: Vista parcial da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

4. RESUTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fungos isolados de ambiente marinhos

Das quatro coletas de solo e de água realizadas na Praia de Candeias durante os períodos de estiagem e chuvoso foram identificadas 57 espécies de fungos filamentosos. A maioria (91,2%) das espécies pertence à Subdivisão Deuteromycotina com 52 espécies, seguido de Ascomycotina, Zygomycotina, com 3 (5,3%) e 2 (3,5%) espécies, respectivamente (Tab. 1). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de fungos em ambientes marinhos feitos na Califórnia, Havaí, Florida, Boa Viagem (PE) (DRABOWA et al., 1954; KISHIMOTO; BAKER, 1969; BERGEN; WAGNER-WENER, 1977; PINTO et al., 1992).

Entre os gêneros isolados do solo distinguiram-se: *Penicillium* (10 espécies), *Aspergillus* (8), *Trichoderma* (3), *Microsphaeropsis* e *Phoma* (2), *Cladosporium*, *Fusarium*, *Malbranchea*, *Varicosporium* e *Thielavia* com uma espécie. Os fungos isolados da água apresentaram resultados semelhantes onde *Penicillium* apresentou-se com 13 espécies, *Aspergillus* (6), *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Phoma* (2), *Curvularia* e *Phomopsis* com uma espécie (Fig. 2 e 3).

Um total de 204 unidades formadoras de colônias foram obtidas representadas principalmente por *Penicillium commune* (71), *Aspergillus niger* (18), *A. janus* (11), *A. sydowii* (8), *Trichoderma virens* (6) e *A. flavus* (5).

Quanto à análise estatística não foi observada diferenças significativas dos fungos isolados do solo em relação aos fungos isolados da água (gl.=8; p=0.1703), assim como não houve diferenças significativas dos fungos isolados da água e do solo em relação a sazonalidade (período chuvoso e estiagem) (gl.= 8; p=0,5943).

Das 57 espécies isoladas e identificadas, 30 foram mencionadas por Pinto et al. (1992) na praia de Boa Viagem, Recife (PE): *Acremonium bacillosporium*, *Aspergillus carbonarius*, *A. flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum*, *Fusarium solani*, *Malbranchea gypsea*, *Microsphaeropsis olivaceae*, *Myrothecium roridum*, *Penicillium brevicompactum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. islandicum*, *P. lividum*, *P. restrictum*, *P. waksmanii*, *Pestalotopsis guepini*, *Phoma capitulum*, *Phoma*

tropica, *Syncephlastrum racemosum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma pseudokoningii*.

Dentre as espécies identificadas, destacam-se *Varicosporium elodeae* e *Penicillium diversum* como primeira ocorrência para o Brasil e América do Sul, respectivamente, como isolados de ambiente marinho. *V. elodeae* foi citada como isolada de folhas decaídas de *Oje* no rio Moranti, no Peru (SHOENLEIN-CRUSIUS; GRANDI, 2003). Enquanto *P. diversum* foi isolado primeiramente em objetos de couro na Europa (RAPER & FENELL, 1977).

Na água foi isolada uma amostra de *Micelia sterilia*. Estudos realizados por Purchio et al. (1988) referiram *M. sterilia* como indicadores de poluição microbiana em água do mar e do rio.

4.2 Parâmetros hidrológicos e dados do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

Durante as coletas, no período de estiagem e chuvoso, o pH da água variou de 7,20 a 7,5 e do solo 7,05 a 7,75. A temperatura oscilou de 23,7°C a 30,2°C na água e 25,7 °C a 28,6 °C, no solo. A salinidade mostrou uma variação de 4‰ a 33‰ na água e 7‰ a 27‰ no solo. A altura da maré foi de 0,2 na estiagem e 0,5 no período chuvoso. A pluviosidade no período chuvoso variou de 327,7 a 359,8mm e, 226,0 a 249,9mm no período de estiagem (Tab. 2).

A germinação dos fungos é marcadamente influenciada pelas condições salinas, especialmente aquelas da água do mar (BORUT; JOHNSON, 1962). Segundo Bergen; Wagner-Merner (1977) espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* suportaram bem a variação de salinidade no solo da Praia de Tampa (Flórida) onde a salinidade variou de 23‰ a 39 ‰.

Trabalho semelhante foi feito por Ristanovič; Miller (1969) onde observaram que os fungos isolados de água do mar suportam a altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) com variação de 0 a 5% do sal, informando os autores que entre as espécies que toleram a uma ampla amplitude de sal destacam-se *Aspergillus niger* e *P. frequentas* com crescimento ótimo no meio contendo 5% de NaCl.

Anderson (1979a) afirmou no seu trabalho com fungos patógenos ao homem, que níveis de salinidade de 6‰ a 50‰ não teve efeito na sobrevivência dos fungos. Níveis de

temperatura acima de 37°C podem ser considerados condições estressantes para a sobrevivência do fungo. Mas a combinação da temperatura e salinidade produz efeitos variados. Alta temperatura e alta salinidade combinadas dão um efeito inibitório na sobrevivência de *Candida albicans in vitro*.

Segundo Jaitly (1987) a concentração de íons de hidrogênio é um dos fatores abióticos que regulam a atividade de crescimento e a composição dos organismos, sendo que muitas espécies de fungos podem desenvolver sob uma ampla faixa de pH de extrema acidez (2 a 3) até extrema alcalinidade (pH 9). O estudo desse autor com fungos isolados do solo de mangue da Índia, variou no pH com crescimento ótimo de pH variando de 4 a 10. *Aspergillus carneus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. niveus*, *Emmericella nidulans* var *lata* e *Thermomyces langinosus* cresceram bem a pH 6. Nesta pesquisa o pH registrado foi alcalino tanto no solo como na água, estando de acordo com Pinto et al. (1992) em ambiente marinho, em solos de deserto da Arábia Saudita por Abdel-Hafez (1982) e em estuário de Neusenewport (EUA) por Borut; Johnson (1962).

Tabela 1: Unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos isolados da água e do solo na praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE, durante os períodos chuvosos e de estiagem.

GENERO/ ESPECIES	ÁGUA						SOLO						TOTAL DE UFC	
	I		II		III		I		II		III			
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E		
ASCOMYCOTINA														
<i>Chaetomium dolichotrichum</i> Ames	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Talaromyces wortmanii</i> (Klocker) C. R. Benjamim	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Thielavia minor</i> (Rayss & Borrut) Malloch & Cain	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
DEUTEROMYCOTINA (FUNGOS ANAMORFOS)														
<i>Acremonium bacillisporium</i> (Onions & Barron) W.Gams	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainer) Thom	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
<i>A. flavipes</i> (Bain. & Sart.) Thom & Church	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>A. flavus</i> Link	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>A. janus</i> Raper & Thom	-	1	-	-	-	-	-	4	-	1	-	5	-	11
<i>A. niger</i> Van Tieghem	-	2	-	3	-	3	1	1	-	5	-	3	-	18
<i>A. parasiticus</i> Speare	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>A. sulphureus</i> (Fres.) Thom & Church	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>A. sydowii</i> (Bainer & Sartory)Thom & Church	-	-	-	1	-	-	-	-	-	6	-	1	-	8
<i>A. terreus</i> Thom	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresenius) de Vries	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. sphaerospermum</i> Penzig	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
<i>C. tenuissimum</i> Cooke	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Curvularia eragrostidis</i> (P. Henn.) J. A. Meyer	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Fusarium nivale</i> (Fr.) Ces.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>F. solani</i> (Mart.) App. & Wr.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Malbranchea gypsea</i> Singler & Carmichael	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (Ahmad.) Sutton	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	2
<i>M. olivaceae</i> (Bonord.) Höhn	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Myrothecium roridum</i> Tode ex. Fr.	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Penicillim brevicompactum</i> Dierckx	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2
<i>P. canescens</i> Sopp	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	-	-	1	-	-	1	-	3	-	-	-	2	-	7

I; II; III= pontos de coletas; C= período chuvoso; E= período de estiagem.

Continuação tabela

GENERO/ ESPECIES	ÁGUA						SOLO						TOTAL DE UFC
	I		II		III		I		II		III		
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	
<i>P. citrinum</i> Thom	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3
<i>P. commune</i> Thom	-	-	1	-	1	-	2	-	1	-	66	-	71
<i>P. crustosum</i> Thom	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>P. diversum</i> Raper e Fenell	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. fellutanum</i> Biourge	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. funiculosum</i> Thom	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	4
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. griseofulvum</i> Thom	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. herquei</i> Bainier & Sartory	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. implicatum</i> Biourge	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	3
<i>P. islandicum</i> Sopp	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. lividum</i> Westling	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. solitum</i> Westling	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>P. waksmanii</i> Zaleski	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Pestalotiopsis guepini</i> (Desm.) Stey.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Phoma capitulum</i> Pawar, Mathur & Thirum	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	4
<i>P. leveillei</i> Boerema & Bollew	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>P. lingam</i> (Tode ex Schw.) Desm.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>P. sorghina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kestern	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. tropica</i> Schneider & Boerema	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	4
<i>Phomopsis archeri</i> Sutton	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	2
<i>T. koningii</i> Rifai	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>T. virens</i> (Miller, Gidden & Foster) von Arx	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-	1	1	6
ZYGOMYCOTINA													
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Syncephalstrum racemosum</i> Cohn ex Schrot	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	3
FUNGOS NÃO ESPORULADOS													
<i>Micelia sterilia</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
TOTAL DE UFC													204

I; II; III= pontos de coletas; C= período chuvoso; E= período de estiagem.

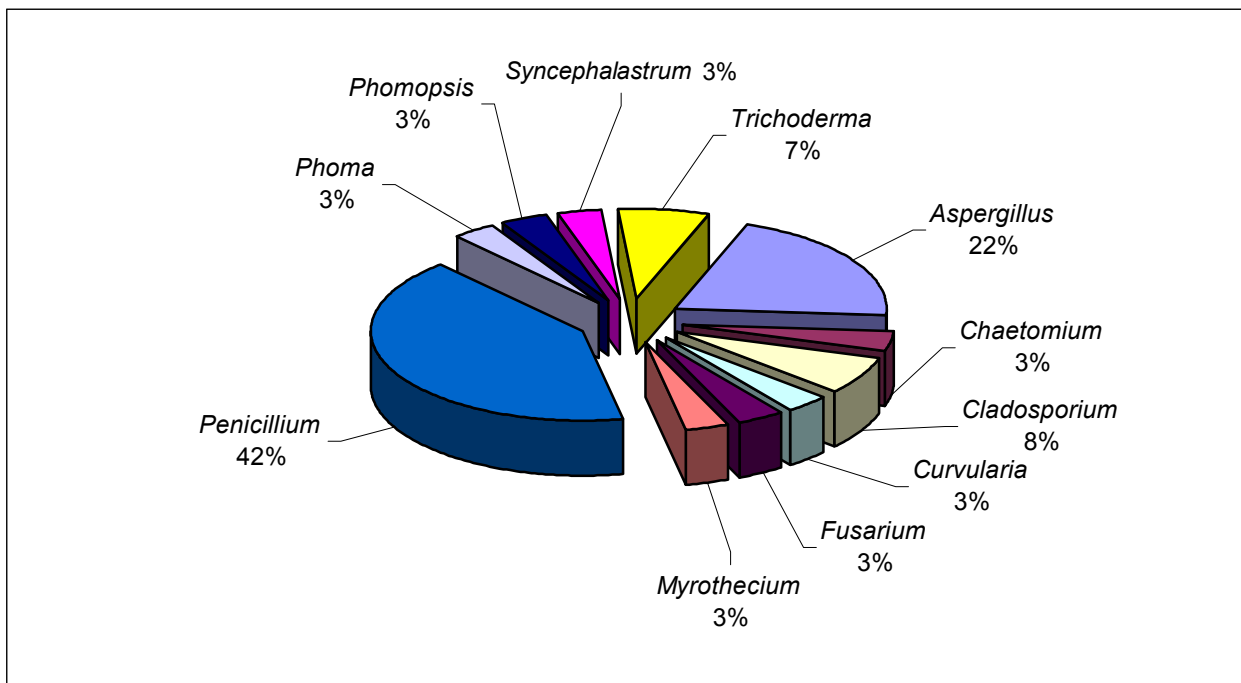


Figura 2: Porcentagem de fungos isolados da água da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

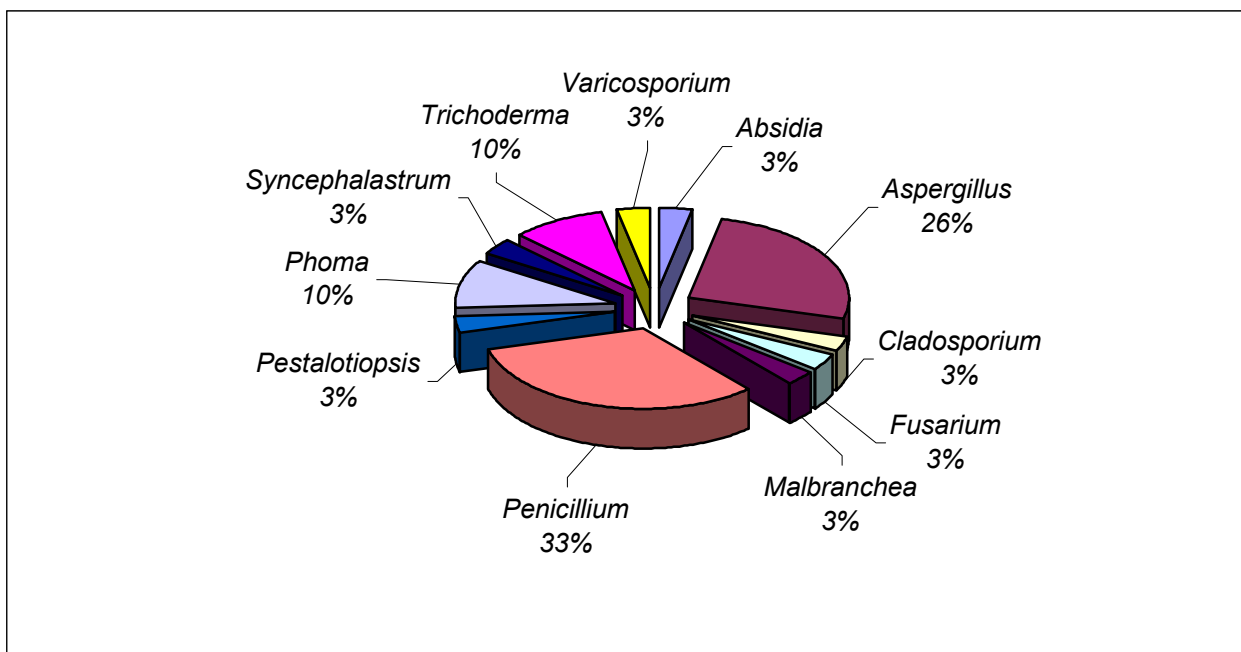


Figura 3: Porcentagem de fungos isolados da solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

Tabela 2: Parâmetros hidrológicos e do solo da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

PARAMETROS / SAZONALIDADE		PERÍODO CHUVOSO	PERÍODO DE ESTIAGEM
pH	Água	7,20- 7,49	7,33-7,5
	Solo	7,4-7,75	7,05-7,3
Salinidade	Água	4‰ - 17‰	25‰-33‰
	Solo	7‰-27‰	16‰-23‰
Temperatura	Água	24,1°C-25°C	23,7°C- 30,2°C
	Solo	25,7°C-27°C	27,6°C 28,6°
Altura da maré		0,5	0,2
Pluviosidade		327,7mm-359,8mm	226,0mm-249,9mm

4.3 Caracterização quanto a fatores de patogenicidade de fungos isolados do solo e da água da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

Foram analisadas 54 espécies de fungos filamentosos isolados do solo e da água da praia de Candeias quanto a fatores de patogenicidade: crescimento a 37°C, atividade proteolítica e fosfolipásica.

Das 54 espécies analisadas 30 expressaram crescimento à 37°C. Quanto à atividade enzimática, 21 espécies apresentaram atividade proteolítica e 26 atividade fosfolipásica (Tab. 3).

Observou que *Aspergillus carbonarius*, *A. flavipes*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium canescens*, *P. corylophilum*, *P. citrinum*, *P. purpurogenum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *Talaromyces wortmanii*, *Phoma capitulum* apresentaram positividade para os três parâmetros. As figuras 4 e 5 mostram a atividade proteolítica e fosfolipásica de *Cladosporium sphaerospermum* e *Myrothecium roridum*, respectivamente.

Em termos de representatividade, espécies de *Penicillium* expressaram melhor as características de patogenicidade com 11 espécies capazes de crescer a 37°C, 12

apresentaram atividade fosfolipásica e nove proteásica, seguido de *Aspergillus* com sete espécies com crescimento a 37°C, atividade proteolítica e fosfolipásica.

Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* consideradas patógenas aos animais, inclusive ao homem são capazes de crescer a 37°C, como: *A. flavipes*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *P. funiculosum* e *P. purpurogenum* (PITT, 1994). *P. purpurogenum* é considerado como oportunista raro causando micoses sistêmicas (HOOG; GUARRO, 1995). Estas espécies também foram isoladas no solo e na água da praia de Candeias, e cresceram a 37°C.

Estudos realizados por Silva et al. (1999) quanto a fatores de patogenicidade de fungos isolados em aveia processada, com as espécies *Aspergillus janus*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Syncephalastrum racemosum* expressaram atividade fosfolipásica. Esses resultados corroboram os achados no presente trabalho, exceto *Syncephalastrum racemosum* que não apresentou atividade positiva para fosfolipase.

De acordo com estudos de Drumond et al. (2001) para determinar as potencialidades de linhagens endofíticas de *Trichoderma*, 100% delas foram positivas na atividade proteolítica. O mesmo não aconteceu nesta pesquisa onde as espécies de *Trichoderma* apresentaram atividade proteásica negativa.

A maioria dos fungos patógenos ao homem e aos animais encontra-se nos Deuteromycotina (Fungos Imperfeitos). Esses fungos além de serem sapróbios, ocasionalmente são patogênicos e podem ser isolados da água, solos, dos animais e do próprio homem, podendo servir como fontes de infecções para micoses superficiais e profundas (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Drabowa et al. (1964) relatam que *Aspergillus* produz uma série de infecções cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. Espécies de *Absidia* (Mucoraceae) são agentes etiológicos de pacientes com doenças debilitantes e que, *Penicillium* e *Fusarium* têm sido observados em pacientes com queratomicose.

Tabela 3: Fatores de patogenicidade de fungos filamentosos isolados da praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes, PE.

ESPECIES	PROTEASE	FOSFOLIPASE	37 ⁰ C
<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter	-	-	+
<i>Acremonium bacillisporium</i> (Onions & Barron)W.Gams	+	-	-
<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom	+	+	+
<i>A. flavipes</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	+	+	+
<i>A. flavus</i> Link	+	-	+
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	+	-	+
<i>A. janus</i> Raper & Thom	+	+	-
<i>A. niger</i> Van Tieghem	+	+	+
<i>A. parasiticus</i> Speare	-	-	+
<i>A. sulphureus</i> (Fres.) Thom & Church	+	-	-
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	-	+	-
<i>A. terreus</i> Thom	+	+	+
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penzig	+	+	-
<i>C. tenuissimum</i> Cooke	-	-	-
<i>Chaetomium dolichotrichum</i> Ames	-	+	+
<i>Curvularia eragrostidis</i> (P.Henn.) J. A. Meyer	-	-	+
<i>Fusarium nivale</i> (Fr.) Ces.	+	-	+
<i>F. solani</i> (Mart.) App. & Wr.	-	-	-
<i>Malbranchea gypsea</i> Singler & Carmichael	-	-	-
<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (Ahmad.) Sutton	-	-	-
<i>M. olivaceae</i> (Bonord.) Höhn	-	-	-
<i>Myrothecium roridum</i> Tode ex. Fr.	-	+	+
<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	+	+	-
<i>P. canescens</i> Sopp	+	+	+
<i>P. citrinum</i> Thom	+	+	+
<i>P. commune</i> Thom	+	+	-
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	+	+	+
<i>P. crustosum</i> Thom	-	-	+
<i>P. diversum</i> Raper e Fenell	-	-	+
<i>P. fellutanum</i> Biourge	-	+	-
<i>P. funiculosum</i> Thom	-	+	+
<i>P. glabrum</i> (Wehmer) Westling	-	+	-
<i>P. griseofulvum</i> Thom	-	+	+
<i>P. implicatum</i> Biourge	+	-	-
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	+	+	+
<i>P. simplicissimum</i> (Oudem.) Thom	+	+	+

Cont. tabela 3

ESPECIES	PROTEASE	FOSFOLIPASE	37 ⁰ C
<i>P. solitum</i> Westling	+	+	+
<i>P. waksmanii</i> Zaleski	-	+	+
<i>Pestalotiopsis guepini</i> (Desm.) Stey.	-	-	-
<i>Phoma capitulum</i> Pawar, Mathur & Thirum	+	+	+
<i>P. sorghina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kestern	-	-	+
<i>P. tropica</i> Schneider & Boerema	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i> Sutton	-	-	-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (Cohn.) Scrot.	-	-	+
<i>Talaromyces wortmanii</i>	+	+	+
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	-	-	-
<i>T. koningii</i> Rifai	-	-	-
<i>T. pseudokoningii</i> Rifai	-	-	+
<i>T. virens</i> (Miller, Gidden & Foster) von Arx	-	+	-
<i>Thielavia minor</i> (Rayss & Borrut) Malloch & Cain	-	-	+
<i>Varicosporium elodeae</i> Kegel	-	-	-

(-): negativo; (+): positivo

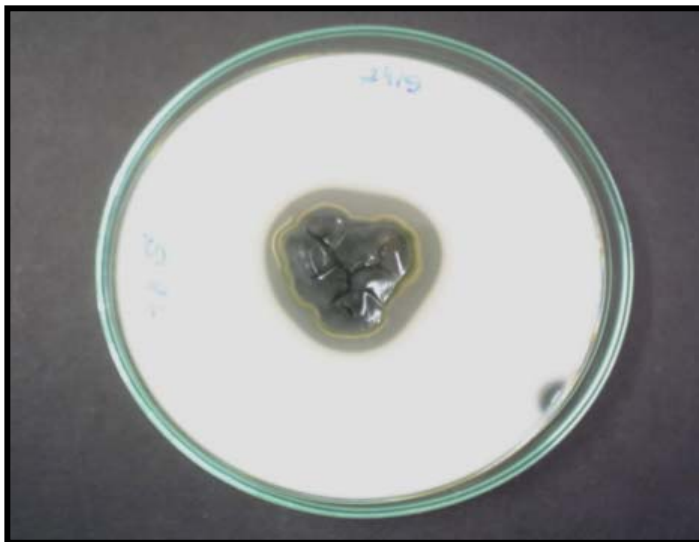


Figura 4: Atividade proteolítica de *Cladosporium sphaerospermum* em 8 dias de crescimento em ágar caseína do leite.

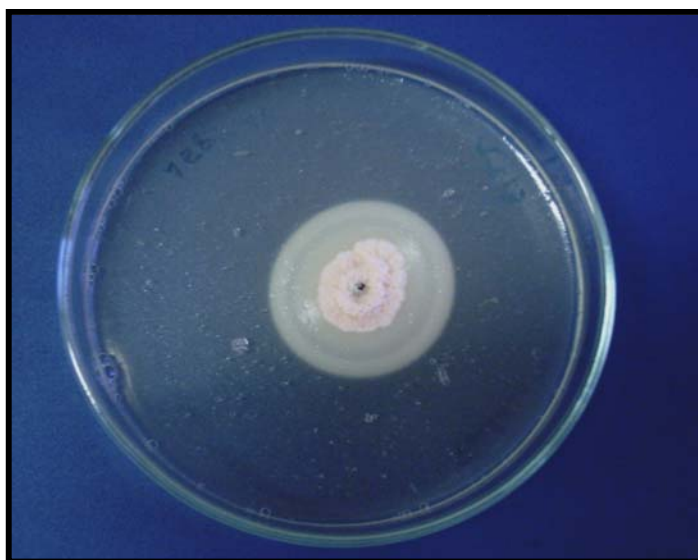


Figura 5: Atividade fosfolipásica de *Myrothecium roridum* em 15 dias de crescimento em ágar Sabouraud + gema de ovo.

5.CONCLUSÕES

Através de observações da diversidade de fungos filamentosos e fungos patógenos na praia de Candeias, pode-se concluir:

- ◆ No solo e na água da Praia de Candeias, Jaboatão dos Guararapes-PE, fungos anamorfos são dominantes;
- ◆ Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são mais representativas;
- ◆ *Varicosporium elodeae* e *Penicillium diversum* constituem novas ocorrências para o Brasil e América do Sul, respectivamente, como isolados de ambiente marinho;
- ◆ As características de patogenicidade avaliadas demonstraram que *Aspergillus carbonarius*, *A. flavipes*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium canescens*, *P. corylophilum*, *P.citrinum*, *P. purpurogenum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *Talaromyces wortmanii*, *Phoma capitulum* podem ser consideradas patógenas;
- ◆ Considerando o número de espécies, *Penicillium* apresentou melhor expressividade quanto a fatores de patogenicidade.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABDEL – FATTAH, S. M.; MOUBASHER, A. H.; ABDEL-HAFEZ, S. I. Studies on mycoflora of salts marshes in Egypt. I Sugar Fungi. **Mycopathologia**, v. 61, p. 19-26. 1977.

ABDEL-HAFEZ, S. I. Survey of the mycoflora of desert soils of Saudi Arabia. **Mycopathologia**, v. 80, p. 3-8, 1982.

ABDULLAH, S. K.; AL-BADER, S. M. On Thermophilic and thermotolerant mycoflora of Iraqi soils. **Sydowia**, v.42, p.1-7, 1990.

AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; NICHOLS, R. A. Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 1370-1374, 1968.

ALBERT, B; BRAY, D.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas. 3º ed., 1997. 1294p.

ALVES , M. H.; CAMPOS – TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. For the production of amylase, lypase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Mycrobiology**, v. 33, p. 325-330. 2002.

ANDERSON, J. H. *In vitro* survival of human pathogenic fungi in Seawater. **Sabouraudia**, v. 17, p.1-12,1979a.

ANDERSON, J. H. *In vitro* of human pathogenic fungi in Hawaiian Beach sand. **Sabouraudia**, v. 17, p.13- 22,1979b.

ATTLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. 3ª ed. 1992, 563p.

AUNSTRUP, K. Industrial production proteolytic enzymes. *In*: Industrial aspects of biochemistry. Federation of European Biochemical Societs, 1974.

BARGHOORN, E. E.; LINDER, D. H. Marine fungi: their taxonomy and biology. **Farlowia**, v.1, p. 395-467, 1944.

BERGEN, L.; WAGNER-MERNER, D. T. Comparative survey of fungi and potential pathogenic fungi from selected beaches in the Tampa Bay area. **Mycologia**, v.69, p.299-308, 1977.

BOOTH, T. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. **Revista de Microbiologia**, v. 10, p.123-138, 1979.

BORUT, S. Y.; JOHNSON, T.W. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. **Mycologia**, v. 54, p. 181-193, 1962.

CARMICHAEL, J. W.; KENDRICK, W.B.; CONNERS. I. L. ; SINGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. Canada: University of Albert Press, 1980, 369p.

CHANG, T.T.; YANG, X. Y.; KO, W. H. A sensitive method for detecting of enzymes by fungi on solid media. **Mycologia**, v. 84, p. 923-926, 1992.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeasts strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 197-202, 2003.

CLARK, F. E. Agar- plate method for total microbial count. *In*: BLACK, C. A. EVANS, D. D. WHITE, J. L., ENSMINGER, L. E., CLARK, F. E., DINAVER, R. C. (eds.). *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties*, New York. Madson Inc, 1965, p. 1460- 1466.

CLARK, S. J. ; YTEMPLETON, M. D.; SULLIVAN, P.A. A Secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata* : purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. **Microbiology**, v. 143, p. 1395-1403, 1997.

CPRH (COMPANHIA PERNAMBUCANA DE CONTROLE DA POLUIÇÃO AMBIENTAL E DE ADMINISTRAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS). Relatório da Bacia hidrográfica do Rio Pirapama e Jaboatão. Recife, 21p. 1999.

COELHO-SANTOS, M.A. Crustáceos decapodos do Litoral de Jaboatão dos Guararapes, PE (BR). Dissertação (Mestrado), 153p, 1993.

COHEN, B. L. Regulation of protease production in *Aspergillus*. **Transaction of the Brithsh Mycological Society**, v. 73, p. 447-450, 1981.

CRUEGER, A.; CRUEGER, W. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. 2^a ed., New York, 1990. 357p.

DABROWA, N. ; LANDAN, J. W; NEWCOMER, V.D.; PLUNKETT,O. A. A survey of tide-washed coastal area of Southern California for fungi potentially pathogenic to man. **Mycopathologia et Mycologia Aplicatta**, v. 24, p 137- 150, 1964.

DIX, N. I.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. Cambridge, University, 1995, 421p.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. San Francisco: Editora IHW- Verlag. v. I, 1993, 369p.

DRUMOND, J. A.; MOLINA, L.; TOLDRA, F. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma* sp. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 33, p. 178-183, 2001.

ELLIS , M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. England: Commonwealth Mycology Institute, 1971,608p.

ELLIS , M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. England: Commonwealth Mycology Institute, 1976, 507p.

FARLEY, P. C.; SULLIVAN. P. A. The *Rhizopus oryzae* secreted aspartic proteinase gene family na analysis of gene expression. **Microbiology**, v. 144, p. 2355-2360, 1998.

FRAZIER, W.C. A method for the detection of changes in gelatin due bacteria. **Journal Infection Disease**, v.39, p. 302-307, 1926.

GACUTAN, M . V. C.; UYENCO, F. R. Marine fungi from Batan. **Aklan. Nat. Applied Science Bull.** , v. 35, p. 1-16, 1983.

GOMES, D. N. F. Caracterização de fungos filamentosos isolados nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda-PE quanto a fatores de patogenicidade. Dissertação (Mestrado), 58p, 2002.

GRAY, W. Y. **The relation of fungi to human affairs**, New York: Inc Henry Holt and Company,1959, 510p.

HANEL *et al.*. Activity of *Candida albicans* isolated from intestine of psoriatic patientes. **Zentrum fur Dermatologie**, v.31, 1989, p. 451-457.

HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597- 607, 1975.

HARLEY, J. L. Fungi in Ecosystems. **Journal of Ecology**, v. 59, p-34-49, 1971.

HOOGE, G. S. DE; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995, 720p.

HOGG, B. M.; HUDSON, H. J. Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica*. The microfungal successions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, p. 185-192, 1966.

HYDE, K. D. Frequency of occurrence of lignicolous marine fungi in the tropics. *In*: MOSS, S. T. The biology of marine fungi in the tropics. Cambridge University Press, Cambridge, 1986, p. 311-322.

HYDE, K. D. Ecological of tropical marine fungi. **Hydrobiologia**, v. 178, p. 199-208, 1989.

HYDE, K. D. **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997, 421p.

HUBE, B. Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Revista Iberomericana de Micologia**, v. 15, p. 65-68, 1998.

HUGHES, G. C. Interdital lignicolous fungi from Newfoundland. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, p. 1409-1417, 1968.

HUGHES, G. C. Geographical distribution of the higher marine fungi. **Veroff. Inst. Neerisforsch Bremerch**, v. 5, p. 419-441, 1974.

JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangrove soils in India. **Transaction Mycological Society Japan**, v. 28, p. 137-143, 1987.

JONES, E. B. G.; TAN, T. K. Observations on manglicolous fungi from Malaysia. **Transaction of the British Mycological Society**, v. 89, p. 390-392, 1987.

JONES, E. B. G.; UYENCO, F. R. ; FOLLOSCO, M. P. Mangrove fungi from the Phillippines, Asian Marine Biology (in press), 1988.

KIRK, P.W.JR. Direct enumeration of marine arenicolous fungi. **Mycologia**, v. 75, p. 670-682, 1983.

KISHIMOTO, R. A.; BAKER, G. F. Pathogenic and potencially pathogenic fungi isolated from beach sands and selected soils of Oahu, Hawai. **Mycologia**, v. 61, p. 537-548, 1969.

KOCH, J. Some lignicolous marine fungi from Thailand, including two new species. **Nord. Journal Botany**, v. 6, p. 497-499, 1986.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine Ecology: The Higher Fungi**. London: Academic Press, 1979.

KOHLMEYER, J. Marine Fungi from Martinique. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 1314-1321, 1981

KOHLMEYER, J. Tropical marine fungi. **Marine Ecology**, v. 5, p. 329- 378, 1984.

KOHLMEYER, J.; VOLKMANN- KOHLMEYER, B. Illustrated Key to the Filamentous higher Marine Fungi. **Botanica Marina**, v. 34, p. 1-61,1991.

KUÉ, J. Production of extracellulatr enzymes by *Cladosporium cucumerinum* . **Phytopathology**, v. 52, p. 961-962, 1962.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia medica : fungos , actnomicetos e algas de interesse médico**. 8ª ed. São Paulo: Savier, 1991, 695p.

LARRONDO, J. V.; CALVO, M. A. Fungal density in the sands of the Mediterranean coast beaches. **Mycopathology** , v. 108, p. 185-193, 1989.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. Worth Publishers, 1993, 1013p.

LEONG, W. F.; TAN, T. K.; JONE, E. B. G. Lignicolous marine fungi in Singapore. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p. 2167-2170, 1988.

LOWE, D. A. **Fungal enzymes in handbook of applied mycology**. Fungal Biotechnology. Eds. ARORA, D. K. , ELANDER, R. P. ; MUKERGI, K. G. , v. 4, 1992, p. 681-706.

MAYSER, P.; LAABS, S.; HEUER, K.; GRUNDER, K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathology**, v. 135, p. 149-155, 1996.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, CHRISTOPHE, Z; HOLDOM, M.; JOUSOM, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of medical Microbiology**, v. 292, p.405-419, 2002.

MOORE- LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. New Jersey, Pentice- Hall Inc., 1996, 574p.

OLIVEIRA, E. E., SILVA, S.C., S., A. J.; ATTUX, B.C.; SILVA, M.R.R. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1998, v.31, n.6, p.523-527.

PELCZAR, M. J. **Microbiologia**. São Paulo: MC Grow-Hill, 1981, 580p.

PINTO, I. M. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PASSAVANTE, J. Z. O. Hongos filamentosos aislados del suelo y el agua en la playa de Boa Viagem (Recife-Pe, Brasil). **Boletín Micológico**, v.7, p.39-45, 1992.

PITT, J. I. A. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 17-32, 1994.

PITT, J. I. A.. **A laboratory guide to commons *Penicillium* species**. Commonwealth., 1988, 187p.

PRICE, M. F.; CAWSON, R. A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Saboraudia**, v.5, p. 179-185, 1977.

PRICE, M. F.; CAWSON, R. A. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Saboraudia**, v. 20, p. 7-14, 1982.

PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Molds from some beaches in the southern area of Sao Paulo state (Baixada Santista), Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 19, p. 166-171, 1988.

RAPER, K. B.; FENELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Malabar Florida: Robert and Krieger. 686p. 1977.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

RIPPON, J. W. **Tratado de Micologia Médica**. Interamericana McGraw- Hill. 3^a ed., 1988, 855p.

RISTANOVIČ, B.; MILLER, C. E. Salinity tolerances and ecological aspects of some fungi collected from fresh-water, estuarine and marine habitats. **Mycophatologia et Micologia Applicata**, v. 37, p. 273-280, 1969.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia**, v. 79, p. 159-185, 1982.

SARQUIS, M. I. M. Incidência de fungos potencialmente patogênicos, oportunistas e alergênicos na areia da praia de Ipanema (RJ). Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro, 1993, 99p.

SCHOENLEIN- CRUSIUS, I. H.; GRANDI, R. A. P. The diversity of aquatic Hyphomycetes in South America. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 183-193, 2003.

SHEN, DA- KANG; NOODEH, A. D.; KAZEMI, A.; GRILLOT, R. ROBSON, G.; BREGÈRE, JEAN-FRANÇOIS. Characterization and expression of phospholipase B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 87-93. 2004.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.

SILVA, E. N. B.; CAVALCANTI, M. A. Q.; SOUZA-MOTTA, C. M. Pathogenity characteristics of filamentous fungi strains isolated from processed oat. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 377-380, 1999.

SUBERKROPP, K. KLUG, M. J. Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. **Ecology**, v. 57, p. 707-719, 1976.

SUNDARI, R.; VIKNESWARY, S.; YUSOFF, M. JONES, E. B. G. Observations on tropical arenicolous marine fungi on driftwood from Malaysia and Singapore. **Botanica Marina**, v. 39, p. 327-333, 1996.

SUHIRMAN; JONES, E. B. G. Preliminary observations on lignicolous marine fungi in the Java Sea, Indonesia. **Ann. Bogr.**, v. 8, p. 35-49, 1983.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes: fungi imperfect with picnidia, acervuli, and stroma.** Kew, CAB International Mycological Institute, 1980, 696p.

TAKAHASHI, M.; BANNO, Y.; NOZAWA, Y. SECRETED *Candida albicans* phospholipase: purification and characterization of two forms of lysophospholipase-transacylase. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.29, p.193-203, 1991.

TAN, T. K. Observations on marine fungi in Singapore and Penang (Malaysia). **Transaction of the Brith Mycological Society**, v. 85, p. 726-727, 1985.

TAN, T. K.; LIM, G. Effects of water pollution of submerged organic debris. **Mycopathologia**, v. 82, p. 121-124, 1983.

TRISKA, K. J. ; SEDELL , J. R.; BUCKLEY, B. The processing of conif and hardwood leaves in two coniferous forest streams: II Biochemical and nutrient changes . **Vereinigung fur Theoretische und Angrwanten Limnologue**, v.19, p. 1628-1639, 1975.

TUBAKI, K.; TAN , T. K. ; OGAWA, Y. Water- borne Hyphomycetes in Singapore with a description of an undescribed species of *Trichocladium*. **Mycotaxon**, v. 46, p. 437-444, 1993.

UDAGAWA, A. S.; UEDA, S. A new species of *Podospora* from marine sediment. **Mycotaxon** , v. 22, p. 399-406, 1985.

UNDERKOLFER, L. A. **Microbial Enzymes in Industrial.** (MILLER, B. M.; LITSKY, W. eds.). New York : Mc Graw and Hill, 1976.

VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N.; LOPES, A.; PETINATE, S.D.G.; CHAIA, A.A.; BRANQUINHA, M. H. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p. 755-760, 1996.

VIDOTTO, V.; KOGA-ITO, C. Y.; MILANO, R.; FIANCHINO, B.; POTÓN, J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans* . **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 16, p. 208-210, 1999.

VOLKMANN-HOHLMEYER, B. ; HOHLMEYER, J. Biogeographic observations of Pacific marine fungi. **Mycologia**, v. 85, p. 337-346, 1993.

VRIJMOED, L. L. P.; HODGKISS, I. J.; TROOWER, L. B. Factors affecting the distribution of lignicolous marine fungi in Hong Kong. **Hydrobiologia**, v.87, p. 143-160, 1982.

VRIJMOED, L. L. P.; HODGKISS, I. J.; TROOWER, L. B. Ocorrence of fungi on submerged pine and teak blocks in Hong Kong coastal waters. **Hydrobiologia**, v.135, p. 109-122, 1986.

WAGNER-MERNER, D. T,. Arenicolous fungi from the South and Central Gulf Coast of Florida. **Nova Hedwigia**, v, 23, p. 915-922, 1972.