



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Dissertação de Mestrado

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTES
HIPERSALINOS VISANDO A OBTENÇÃO DE PRODUTOS A PARTIR
DE LIGNINA**

LAURA CARVALHO ALVES DE OLIVEIRA

Brasília – DF

2025

LAURA CARVALHO ALVES DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DE AMBIENTES HIPERSALINOS
VISANDO A OBTENÇÃO DE PRODUTOS A PARTIR DE LIGNINA

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília como parte
dos requisitos parciais para obtenção
do título de mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Microbiana.

Orientador (a):

Dr^a Betania Ferraz Quirino

Brasília, 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

De Oliveira, L. C. A.

Bioprospecção de fungos isolados de ambientes hipersalinos visando a obtenção de produtos a partir de lignina

Laura Carvalho Alves de Oliveira

Brasília, 2025.

Número de páginas: 172

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia

Microbiana, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

I- Palavras chaves: *bioprodutos, biomassa lignocelulósica, desconstrução microbiana, halotolerantes, halófilos.*

II- Universidade de Brasília. PPG/BioMicro.

III- Bioprospecção de fungos isolados de ambientes hipersalinos visando a obtenção de produtos a partir de lignina

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais, para que possamos temer menos.”

(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Francilene, e às minhas irmãs, Maria Clara e Beatriz, que constituem o meu principal suporte nas decisões que me conduziram até este caminho e que, de forma incondicional, estarão presentes nos próximos degraus da minha trajetória. Desejo sempre trazer-lhes orgulho na minha construção pessoal e profissional.

À minha irmã de consideração, Jullyane, por fazer parte da minha rede de apoio, sempre me escutando de forma paciente e incentivando minhas ideias.

Aos meus colegas de laboratório da Embrapa (Raissa, Nathalia, Ananda, Pedro, Heloyanne, Júlia, Isadora, Gabriela, Luísa e Kamila), pelo suporte fundamental durante o período do mestrado, seja por meio de conversas construtivas sobre experimentos desafiadores, pelo apoio emocional em jornadas exaustivas de trabalho, pelo auxílio diante de imprevistos de laboratório ou, sobretudo, pela construção de amizades que certamente ultrapassarão esta etapa acadêmica. Sou grata por ter conhecido pessoas tão incríveis, que tornaram esta jornada mais leve.

À Dra. Jéssica Bergmann, que, sempre solícita, atuou como uma coorientadora e se tornou uma importante referência em minha formação.

Aos Mestres Mateus Florentino e André Júnior, que foram guias essenciais no processo de adaptação ao laboratório, companheiros de trabalho ao longo de grande parte do mestrado, oferecendo auxílio em momentos decisivos e construindo uma amizade que seguirá para além do ambiente acadêmico.

Aos meus amigos de longa data, Vitória, Thais, Ana, Samantha, André e Pedro, que fazem parte da construção da minha história, permanecendo presentes e me apoiando ao longo de todo este percurso. Sou grata pela amizade de vocês, que resiste ao tempo e à distância, sem se perder.

Aos Drs. Marcelo Ferreira Fernandes, Clenilson Martins Rodrigues e Alan Kelbis Oliveira Lima, bem como ao Me. Mateus Florentino Barbosa, pelas colaborações fundamentais que possibilitaram a construção deste projeto.

À Dra. Betania Ferraz Quirino, pela oportunidade de integrar este trabalho e pela orientação ao longo de todo o processo.

À Embrapa, pelo fornecimento da infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho, a qual foi essencial para meu crescimento profissional e para a

vivência de experiências enriquecedoras, inclusive pelo convívio com colegas que contribuíram de maneira significativa para esta jornada.

À Capes, pelo apoio por meio da concessão de bolsa de estudos.

À Universidade de Brasília (UnB), pela oportunidade e pela estrutura disponibilizada, que foram determinantes para a minha formação e qualificação profissional.

RESUMO GERAL

De Oliveira, Laura Carvalho Alves. Bioprospecção de fungos isolados de ambientes hipersalinos visando a obtenção de produtos a partir de lignina. 2025. Número de páginas (172). Dissertação (Biologia Microbiana) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Biomassas lignocelulósicas são abundantes na natureza e apresentam potencial para o desenvolvimento sustentável de bioprodutos de baixo custo. A lignina, um de seus principais componentes, possui estrutura complexa e recalcitrante, o que dificulta seu uso industrial. No entanto, sua bioconversão por microrganismos isolados a partir de ambientes naturais hipersalinos representa uma estratégia promissora. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar microrganismos, especialmente fungos, capazes de utilizar lignina como fonte de carbono, visando à produção de bioprodutos com aplicação potencial nas indústrias e na agricultura. Amostras de liteira foram coletadas em áreas hipersalinas, salina e apicum, adjacentes a um manguezal do estuário do Rio Vaza-Barris (SE). Elas foram processadas por plaqueamento direto e cultura de enriquecimento em meio líquido contendo lignina Kraft como única fonte de carbono, sob diferentes concentrações de NaCl (0%, 4,5% e 11%). Foram obtidos 88 microrganismos, incluindo 35 fungos filamentosos, dos quais 32 foram identificados taxonomicamente por meio das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina, abrangendo 16 gêneros distintos. Os isolados foram avaliados quanto ao crescimento em ligninas industriais (Kraft e organosolv) e em monômeros fenólicos, com e sem adição de NaCl. Também foi realizado um screening para atividade de lacase, e os isolados com melhor desempenho foram selecionados para análises cromatográficas (UPLC-PDA) e de produção de fitohormônios, derivados metilados de AIA, e do regulador de defesas de plantas ácido salicílico (UPLC-MS). Alguns isolados apresentaram resultados positivos quanto à produção desses compostos. Os resultados destacam a capacidade desses fungos em desconstruir lignina e gerar produtos para aplicações biotecnológicas em indústrias e na agricultura.

Palavras chaves: bioprodutos, biomassa lignocelulósica, desconstrução microbiana, halotolerantes e halófilos.

GENERAL ABSTRACT

De Oliveira, Laura Carvalho Alves. Bioprospection of fungi from hypersaline environments for the production of products from lignin. 2025. Number of pages (172). Thesis – University of Brasília, Brasília, DF.

Lignocellulosic biomass is abundant in nature and offers potential for the sustainable development of low-cost bioproducts. Lignin, one of its main components, has a complex and recalcitrant structure, hindering its industrial use. However, its bioconversion by microorganisms isolated from hypersaline natural environments represents a promising strategy. This study aimed to isolate and characterize microorganisms, particularly fungi, capable of utilizing lignin as a carbon source, aiming at the production of bioproducts with potential applications in industry and agriculture. Litter samples were collected from hypersaline, saline, and apicum areas adjacent to a mangrove swamp in the Vaza-Barris River estuary (SE). They were processed by direct plating and enrichment culture in liquid medium containing Kraft lignin as the sole carbon source, under different NaCl concentrations (0%, 4.5%, and 11%). Eighty-eight microorganisms were obtained, including 35 filamentous fungi, of which 32 were taxonomically identified by the ITS, β -tubulin, and calmodulin regions, spanning 16 distinct genera. The isolates were evaluated for growth on industrial lignins (Kraft and organosolv) and phenolic monomers, with and without the addition of NaCl. Laccase activity was also screened, and the best-performing isolates were selected for chromatographic analysis (UPLC-PDA) and for the production of phytohormones, methylated derivatives of IAA, and the plant defense regulator salicylic acid (UPLC-MS). Some isolates showed positive results for the production of these compounds. The results highlight the ability of these fungi to deconstruct lignin and generate products for biotechnological applications in industry and agriculture.

Keywords: bioproducts, lignocellulosic biomass, microbial deconstruction, halotolerants and halophiles.

LISTA DE ABREVIATÖES

AIA = ácido indol-3-ácetico;
°C = grau celsius;
DMP = dimetoxifenol;
DNA = ácido desoxirribonucleico;
EF-1 α = translation elongation factor 1 α ;
g = grama;
h = hora;
ITS = internal transcribed spacer;
Kg = quilograma;
L = litro;
LiP = lignina peroxidase;
 μ g = micrograma;
mg = miligrama;
 μ L = microlitro;
mL = mililitro;
mm³ = metro cúbico;
min = minutos;
NaCl = cloreto de sódio;
nm = nanômetro;
PCR = reação em cadeia da polimerase;
rpm = rotações por minuto;
s = segundos;
UPLC = cromatografia líquida de ultra desempenho;
V = vultz.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica. _____	18
Figura 2 - Estrutura de composição da estrutura da celulose. _____	18
Figura 3 - Monômeros que compõem a estrutura da hemicelulose. _____	19
Figura 4 - Exemplo de estrutura de um heteropolímero de lignina. _____	20
Figura 5 - Região região ITS localizada entre 18 rDNA e 28 rDNA. _____	24
Figura 6 - Imagens da região de coleta das amostras. _____	37
Figura 7 - Mapa do Brasil destacando as coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras . _____	38
Figura 8 Esquema detalhando os experimentos de plaqueamento direto e cultura de enriquecimento. _____	40
Figura 9 - Etapas de extração de DNA genômico, amplificação de região ITS por PCR, sequenciamento das regiões amplificadas, identificação e posteriormente utilização do UPLC. _____	43
Figura 10 - Alinhamento de sequências foward e reverse utilizando o Bioedit 7.2. _____	44
Figura 11 - Fórmula para cálculo de atividade de lacase _____	47
Figura 12 - Coleção de isolados fúngicos de ambiente salino _____	51
Figura 13 - Distribuição dos isolados fúngicos obtidos em meios M9, Mandel's & Weber e Czapek com lignina Kraft Sigma como fonte de carbono e com NaCl a 0, 4,5 e 11 %. _____	52
Figura 14 - DNA genômico obtido através da extração de DNA. _____	53
Figura 15 - Produto de PCR da amplificação da região ITS de fungos. _____	54
Figura 16 - Distribuição dos isolados fúngicos quanto aos gêneros pertencentes com base na identificação utilizando o marcador molecular ITS. _____	58
Figura 17 - Árvore filogenética dos 31 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador ITS. _____	59
Figura 18 - Árvore filogenética dos 19 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador β -tubulina _____	63
Figura 19 - Árvore filogenética dos 8 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador calmodulina. _____	67

Figura 20 - <i>Heatmap</i> do crescimento em ligninas industriais a 1% (m/v) de 35 diferentes isolados fúngicos provenientes de ambiente hipersalinos	69
Figura 21 - Diagrama de Venn - Crescimentos em ligninas industriais sem NaCl	69
Figura 22 - <i>Heatmap</i> do crescimento em ligninas industriais em NaCl de 35 diferentes isolados fúngicos provenientes de ambiente hipersalinos	72
Figura 23 - Diagrama de Venn - Crescimentos em ligninas industriais na presença de 2% (m/v) NaCl demonstrando a distribuição de crescimento nas 3 ligninas, considerando o melhor crescimento de cada isolado em 30 dias.	72
Figura 24 - Número de isolados de acordo com atribuição máxima de cada isolado em 30 dias em ligninas industriais, sem e com adição de NaCl	73
Figura 25 - <i>Heatmap</i> do crescimento dos isolados fúngicos de ambiente salino em compostos fenólicos	74
Figura 26 - Número de isolados que cresceram no meio sólido Mandel's & Weber a 28 °C suplementado com compostos fenólicos.	75
Figura 27 – Gráfico da atividade lacase usando 2,6-dimetoxifenol.	77
Figura 28 - Cromatograma de extratos fungicos em UPLC a 210 nm.	78
Figura 29 - Cromatograma de extratos fúngico de <i>Scedosporium ellipsoideum</i> , *1CZL1%<i>s/s</i>Apicum28°C , em UPLC	80
Figura 30 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> , 2MWL0,1%+s4,5%<i>Apicum28°C</i> .	82
Figura 31 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Alfoldia vorosii</i> , 4CZL1%<i>s/s</i>Apicum28°C .	84
Figura 32 – Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Trichoderma harzianum</i> , 7M9L1%<i>s/s</i>Salina37°C .	86
Figura 33 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Massarina sp.</i> , 15MWL1%<i>s/s</i>Apicum28°C .	88
Figura 34 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Peroneutypa rubiformis</i> , 18MWL1%<i>s/s</i>Apicum28°C .	90
Figura 35 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Análise dos sobrenadantes de <i>Aspergillus neoniger</i> , 20MWL1%<i>s/s</i>Apicum28°C .	92
Figura 36 - Quantificação de ácido indol-3-ácetico (µg/mL) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino.	94

Figura 37 - Quantificação de ácido indol-3-ácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino. _____	95
Figura 38 - Quantificação de ácido 5-Metoxi-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino. _____	96
Figura 39 - Quantificação de ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos. _____	97
Figura 40 - Quantificação de ácido 2-metil-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino. _____	98
Figura 41 - Quantificação de ácido salicílico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino. _____	99
Figura 42 - Inóculo de <i>Aspergillus neoniger</i> (20MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C) e controle negativo. _____	112

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIACÕES	9
LISTA DE FIGURAS	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Bioeconomia.....	17
1.1.1 Celulose	18
1.1.2 Hemicelulose	19
1.1.3 Lignina.....	19
1.2 Fungos de ambiente hipersalinos.....	21
1.2.1 Apicum e Salina	23
1.3 Identificação taxonômica utilizando marcadores moleculares.....	23
1.3.1 ITS.....	24
1.3.2 Calmodulina	24
1.3.3 β -tubulina	25
1.4 Ligninas Industriais.....	25
1.5 Compostos fenólicos	26
1.5.1 Catecol	26
1.5.2 Ácido 4 hidroxibenzoico	27
1.5.3 Ácido vanílico	27
1.6 Enzimas lignolíticas	27
1.6.1 Lacases	27
1.6.2 Manganês peroxidases	28
1.6.3 Dye-de decolorizing peroxidases	29

1.6.4	Peroxidasas versáteis	29
1.6.5	Lignina peroxidases	29
1.7	Bioprodutos de Lignina.....	30
1.7.1	Vanilina.....	34
1.7.2	Ácido protocatecuico	34
1.7.3	Bioinsumos agrícolas	34
2	OBJETIVO GERAL.....	35
2.1	Objetivos específicos:.....	35
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	Material e Métodos	37
4.1	Coleta, processamento e isolamento a partir das amostras de liteira Salina e Apicum	37
4.2	Isolamento fungos filamentosos e obtenção de culturas puras	40
4.3	Isolamento de bactérias ou leveduras	41
4.4	Estoque de fungos filamentosos.....	41
4.5	Extração de DNA de fungos filamentosos	42
4.6	PCR para amplificação das regiões ITS 1 e ITS 4 e purificação do amplicon 43	
4.7	Identificação taxonômica molecular.....	44
4.8	Crescimento em ligninas industriais	45
4.9	Crescimento em compostos fenólicos derivados de lignina	45
4.10	Cultivo em meio líquido Mandel's & Weber para indução enzimática de lacase46	
4.10.1	Ensaio de atividade lacase com 2,6-dimetoxifenol.....	46
4.11	Cultivo líquido para análise de sobrenadantes no UPLC	47
4.11.1	Análise dos sobrenadantes fúngicos no UPLC-PDA.....	48
4.11.2	Análise dos sobrenadantes fúngicos no UPLC-MS.....	48
5	Resultados.....	50

5.1	Coleção de microrganismos de ambiente hipersalino	50
5.1.1	Identificação taxonômica usando a região ITS.....	52
5.1.2	Identificação taxonômica usando o marcador molecular β -tubulina	60
5.1.3	Identificação taxonômica usando o marcador molecular calmodulina. 65	
5.2	Crescimento em ligninas industriais	68
5.3	Crescimento em compostos fenólico	74
5.4	Atividade enzimática de lacase utilizando 2,6-DMP	76
5.5	Análise cromatogramas	78
5.5.1	<i>Scedosporium ellipsoideum</i> (*1CZL1% <i>s/s</i> Apicum28°C).....	80
5.5.2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (2MWL0,1%+ <i>s</i> 4,5%Apicum28°C).....	82
5.5.3	<i>Alfoldia vorosii</i> (4CZL1% <i>s/s</i> Apicum28°C).....	84
5.5.4	<i>Trichoderma harzianum</i> (7M9L1% <i>s/s</i> Salina37°C).....	86
5.5.5	<i>Massarina sp.</i> (15MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C).....	88
5.5.6	<i>Peroneutypa rubiformis</i> (18MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C)	90
5.5.7	Cromatograma <i>Aspergillus neoniger</i> (20MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C).....	92
5.6	Produção de fitohormônios.....	94
5.6.1	Análise de ácido indol-3-ácetico (AIA).....	94
5.6.2	Análise de ácido 1-metil-3-indolácetico	95
5.6.3	Análise de ácido 5-Metoxi-3-indolácetico	96
5.6.4	Análise de ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico	97
5.6.5	Análise de ácido 2-metil-3-indolácetico	98
5.6.6	Análise de ácido salicílico.....	98
6	Discussão	99
6.1	Construção da coleção de fungos filamentosos provenientes de áreas hipersalinas isolados em meios com lignina kraft como fonte de carbono	99
6.1.1	Identificação taxonômica usando o marcador ITS.....	101
6.1.2	Identificação taxonômica usando o marcador β -tubulina	102

6.1.3	Identificação taxonômica usando o marcador calmodulina	103
6.1.4	Revisão da literatura para os gêneros dos isolados identificados	103
6.2	Ligninas industriais	110
6.3	Crescimento em compostos fenólicos	110
6.4	Ensaio enzimático de lacase.....	111
6.5	Análises UPLC-PDA e UPLC- MS Xevo TQD	113
6.6	Análises dos sobrenadantes fúngicos por UPLC-PDA	114
6.7	Análise de fitohormônios UPLC-MS Xevo TQD.....	115
7	Conclusões.....	116
8	Perspectivas Futuras	119
REFERÊNCIAS		120
ANEXOS.....		148
Apêndice A.....		172

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Bioeconomia

A adoção de práticas alinhadas ao desenvolvimento sustentável tornou-se imprescindível diante de um cenário marcado pela exploração desenfreada dos recursos naturais, que tem causado sérios danos ambientais, contribuindo para as mudanças climáticas e favorecido o surgimento de novos patógenos com potencial pandêmico (AGUILAR; TWARDOWSKI, 2022). Essa demanda social por processos mais sustentáveis exige a adoção de novas estratégias, como a transição de um modelo de economia linear — baseado na extração e descarte de recursos — para uma economia circular, que busca conciliar crescimento econômico e sustentabilidade (CORONA *et al.*, 2019).

O avanço necessário rumo à sustentabilidade pode ser viabilizado por meio de investimentos em políticas de conscientização e preservação ambiental, bem como no desenvolvimento de tecnologias baseadas em matérias-primas renováveis e processos menos poluentes (PAPADOPOULOU; LOIZOU; CHATZITHEODORIDIS, 2022). Nesse cenário, a biomassa lignocelulósica tem ganhado destaque devido à sua abundância, baixo custo e ampla gama de aplicações potenciais (MUJTABA *et al.*, 2024). Trata-se de um recurso renovável presente em todas as plantas, composto majoritariamente por três polímeros estruturais: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1) (DASHORA *et al.*, 2022).

Para que essa biomassa seja aproveitada de forma eficiente, é necessário promover sua desconstrução, o que na indústria é realizado por meio de pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos. Esses métodos têm como objetivo despolimerizar a estrutura complexa que conecta seus componentes, permitindo sua liberação para aplicações subsequentes (RODIONOVA *et al.*, 2022).

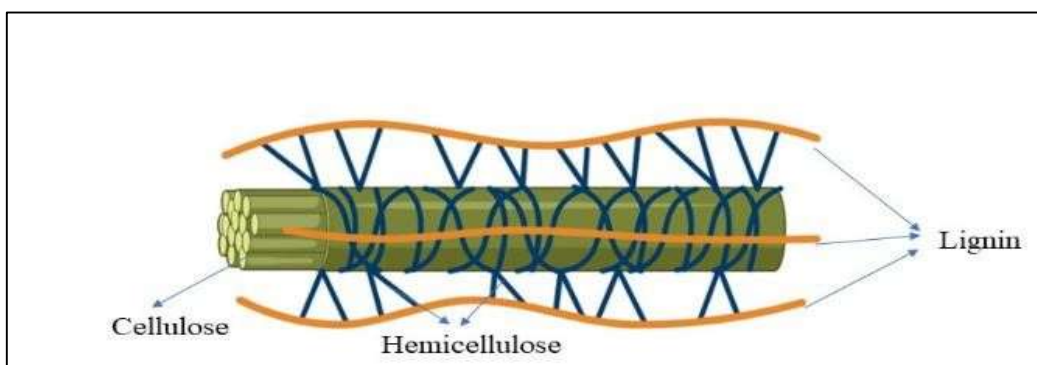


Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica (DASHORA *et al.*, 2022).

1.1.1 Celulose

A celulose, o homopolissacarídeo natural mais abundante na biomassa lignocelulósica, é formada por unidades repetidas de celobiose (Figura 2), as quais consistem em dímeros de D-glicose conectados por ligações β -1,4-glicosídicas (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2020). Suas cadeias lineares conferem alta estabilidade estrutural e insolubilidade, características que a tornam atrativa para diversas aplicações. Essas propriedades permitem a obtenção de produtos como fibras, amplamente utilizadas nas indústrias têxtil e de papel (ETALE *et al.*, 2023).

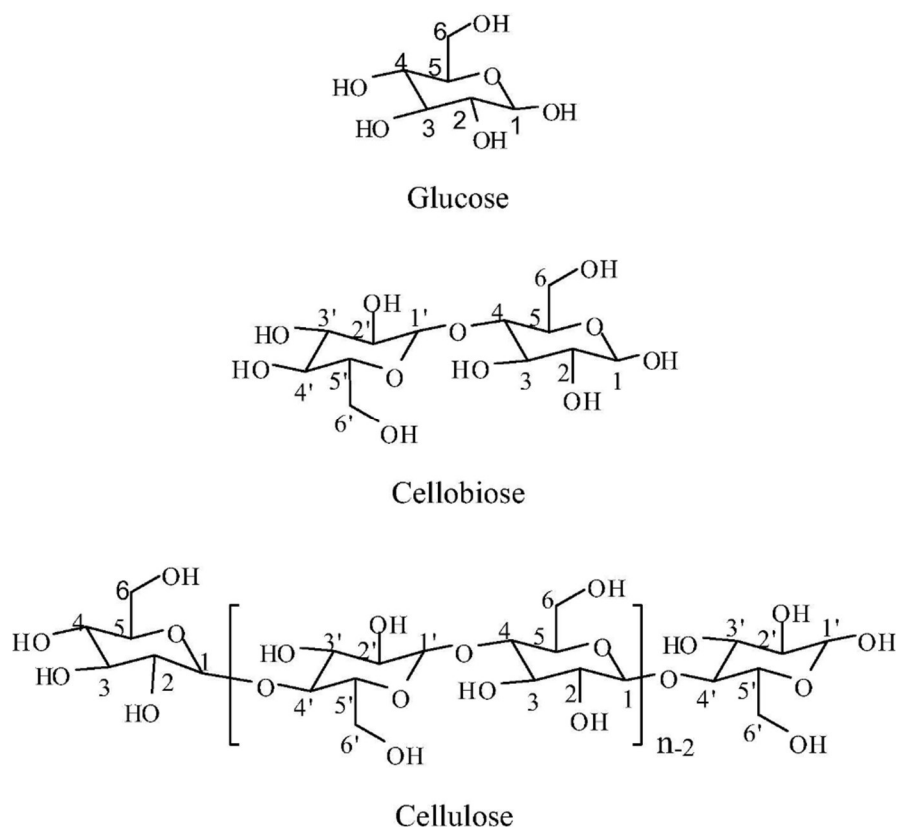


Figura 2 - Estrutura de composição da estrutura da celulose (SUHAS; GUPTA *et al.*, 2016)

1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo de estrutura heterogênea, composta por diferentes tipos de açúcares, como mananas, glucanas e xilanas (Figura 3). Presente na parede celular das plantas, ela contribui para a integridade estrutural e pode atuar como reserva de energia. A hidrólise da hemicelulose em açúcares menores a torna particularmente atrativa para processos fermentativos, especialmente na produção de biocombustíveis (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

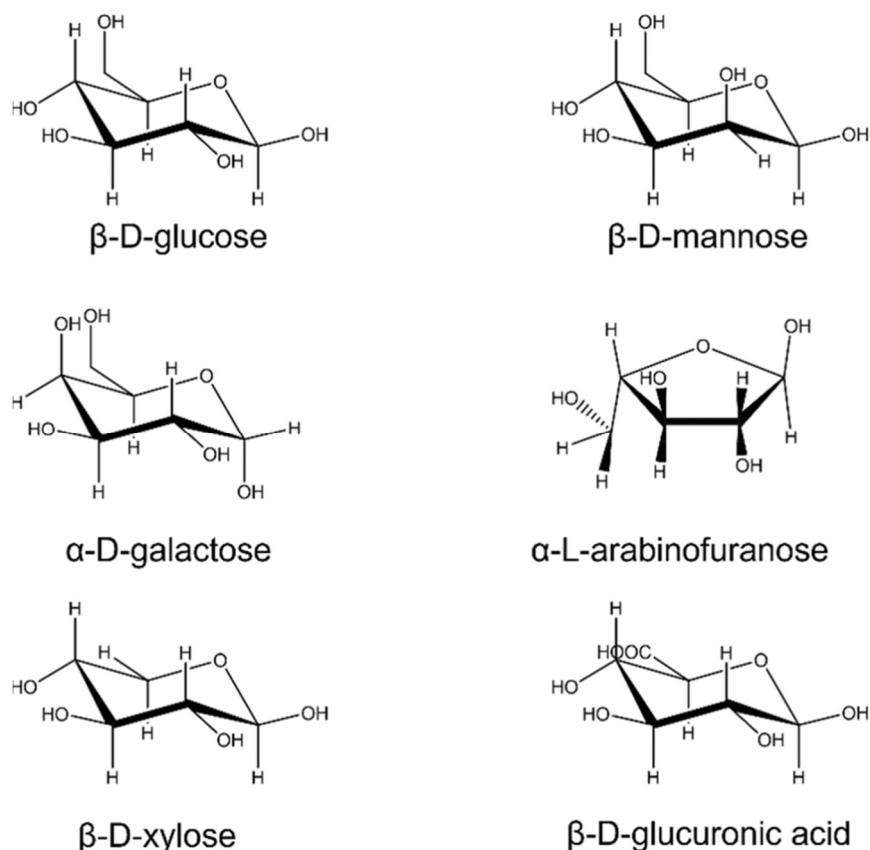


Figura 3 - Monômeros que compõem a estrutura da hemicelulose (MATHURA *et al.*, 2024).

1.1.3 Lignina

A lignina é o heteropolímero aromático mais abundante da natureza, que associado à hemicelulose e celulose, confere rigidez e proteção às plantas. Em termos de estrutura, a lignina é formada pela ligação dos monólignóis álcool cumarílico (H), álcool coniferílico (G), que possui um grupo metoxi na posição 3 do anel aromático, e álcool sinapílico (S), que possui dois grupos metoxi nas posições 3 e 5 (ATIWESH *et al.*, 2022). Vários tipos de ligações covalentes podem ocorrer entre as unidades de

lignina, como β -5 e β - β , mas a prevalente é a do tipo β -O-4 (JANUSZ, *et al.* 2019). O conteúdo de lignina varia de acordo com cada planta, assim como a porcentagem de cada monolignol e as ligações. Por exemplo, em espécies coníferas a porcentagem em peso varia de 26-34% e há predominância de unidades G (BALK *et al.*, 2023).

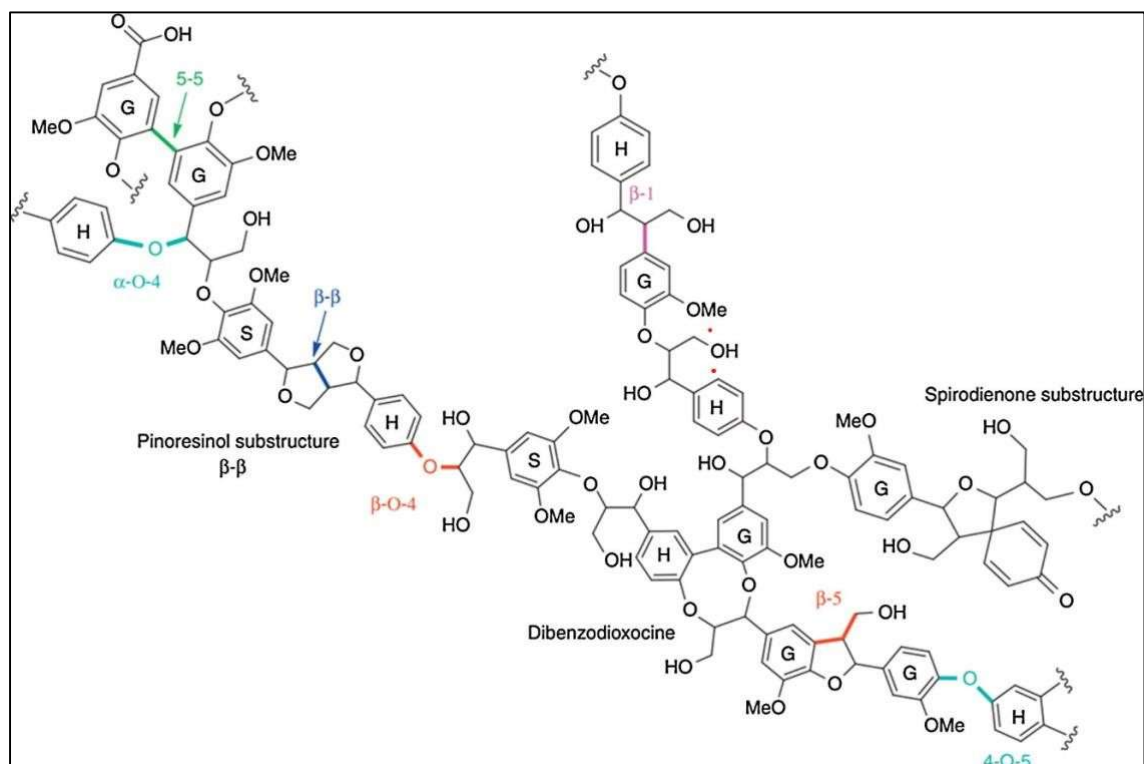


Figura 4 - Exemplo de estrutura de um heteropolímero de lignina (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

Além da sua estrutura complexa (Figura 4), a recalcitrância dificulta a utilização da lignina em processos industriais (IRAM; BERENJIAN; DEMIRCI, 2021). Fator este que se torna um empecilho no aproveitamento total da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias (YAO *et al.*, 2021). Atualmente, a maior parte da lignina que é liberada no tratamento de biomassa vegetal, tem como destinação a incineração para geração de energia, logo, o aproveitamento em produtos de valor agregado é bem pequeno (SHOREY *et al.*, 2024). Dependendo do pré-tratamento químico que é empregado para a desconstrução se obtêm diferentes tipos de lignina na indústria, como por exemplo, a lignina Kraft e Organosolv (YAO *et al.*, 2022).

Sendo a lignina uma molécula complexa, a sua quebra exige a atuação de um conjunto de enzimas como lacases, manganês peroxidases (MnP), hidrolases, versátil peroxidases (VP), peroxidases descolorante de corante (DyP) e lignina peroxidases (LiP) (IRAM; BERENJIAN; DEMIRCI, 2021).

Na natureza, um conjunto de microrganismos está envolvido de forma a atuarem sinergicamente em diferentes etapas do processo de desconstrução desse heteropolímero aromático fazendo com que sua estrutura seja quebrada em moléculas cada vez menores, através de um complexo de reações com a atuação de diferentes enzimas (AHMAD *et al.*, 2023). Como exemplo, temos os fungos da podridão branca que são relacionados à capacidade de degradar lignina de maneira eficiente, geralmente sendo encontrados em locais úmidos com matéria orgânica em decomposição (SHIN *et al.*, 2019; SAHU *et al.*, 2011). A adaptabilidade de fungos por meio da sua aptidão para a produção de enzimas e metabólitos secundários permite um papel importante na desconstrução da lignina, além possibilitar a sobrevivência sob variadas condições na natureza, inclusive em ambientes hipersalinos (AMOOZEGAR *et al.*, 2019).

1.2 Fungos de ambiente hipersalinos

A exploração insustentável dos recursos naturais pelas atividades humanas tem contribuído significativamente para a intensificação do aquecimento global. Os efeitos resultantes desse processo têm provocado alterações climáticas abruptas, representando uma ameaça crescente à manutenção da vida no planeta (ABBASS *et al.*, 2022). Nesse contexto, alternativas para remediar condições futuras alarmantes têm sido discutidas e estudos de microrganismos que atuam em condições extremas se intensificado, em busca de usos na agricultura, médicos, processos industriais mais limpos e outros (RODRÍGUEZ *et al.*, 2024). Fungos de ambientes extremos possuem tipicamente um crescimento lento devido às adaptações que possuem para sobrevivência, pois estas requerem um alto gasto energético. Assim, eles podem adotar estratégias que os tornam generalistas, ou seja, se desenvolvendo em ambientes moderados e extremos, ou especialistas, se limitando a ambientes extremos (GOSTINČAR; ZALAR; GUNDE-CIMERMAN, 2021). Eles se desenvolvem em condições adversas em que os nutrientes disponíveis se encontram reduzidos, seja em pH ácidos ou alcalinos, temperaturas, ou concentrações salinas extremos.

Nesse contexto, a sobrevivência de fungos em ambientes hipersalinos é possível devido ao desenvolvimento de mecanismos que permitiram a adaptabilidade deles a altas concentrações salinas (ALEKSEYEVA; HERNDL; BALTAR, 2024), a exemplo do acúmulo de solutos orgânicos para suportar a pressão osmótica e pela

modificação da composição da membrana plasmática para evitar desnaturação de sua estrutura (FERNANDO *et al.*, 2023). Microrganismos que crescem em ambientes salinos são classificados em: (i) halotolerantes, que toleram o sal, mas também crescem na sua ausência; (ii) halófilos moderados, que requerem concentrações de 0,5 a 2,5 M de NaCl; e (iii) halófilos extremos, que necessitam de 1,5 a 4,0 M de NaCl para seu desenvolvimento (WINGFIELD; JITPRASITPORN; CHE-ALEE, 2023).

A capacidade adaptativa desses microrganismos, seja em nível genético, estrutural ou metabólico, os torna fontes promissoras para a prospecção de biocompostos, frequentemente produzidos em resposta ao estresse imposto por condições extremas (PATANKAR, 2021; AGRAWAL; CHAVAN; DUFOSSÉ, 2024). Dentre os produtos obtidos a partir de fungos halófilos, destacam-se os pigmentos, como os carotenos produzidos por *Fusarium* sp. T1 e a melanina sintetizada por diversas espécies halófilas, incluindo *Hortaea werneckii* e *Phaeothea triangularis* (GHATTAVI *et al.*, 2022; SLIZEWSKA; SWITA; MIKOŁAJCZYK, 2023). Além disso, essas espécies são fontes de enzimas halofílicas, cuja atividade ótima ocorre em elevadas concentrações salinas, uma característica vantajosa para processos industriais. Entre os exemplos de processos fermentativos com alto teor de salinidade, estão a produção de molho de soja e coalhada, em que as enzimas precisam ficar estáveis por todo processo e não alterar o sabor do produto final (PÓCSI *et al.*, 2024).

Um importante campo de aplicação de fungos de ambientes salinos é o agrícola. Neste ambiente, a salinidade tem se tornado foco de preocupações em plantações, sendo que esses microrganismos podem ajudar na tolerância e absorção de nutrientes sob tal condição de estresse. A salinização do solo pode se dar devido a diferentes fatores, como uso excessivo de fertilizantes, falta de chuva e irrigação inadequada (TAROLLI *et al.*, 2024). Em sistemas de cultivo como o arroz irrigado, o encharcamento contínuo do solo pode promover sua saturação hídrica. Essa condição favorece o acúmulo de sais, devido ao movimento ascendente da água proveniente do lençol freático, e compromete a disponibilidade da água subterrânea a longo prazo (KARIMZADEH *et al.*, 2024). A salinização do solo implica na redução do crescimento das plantas e acúmulo de íons tóxicos, como Na⁺ e Cl⁻, o que pode levar à morte destas (ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019), além de afetar a fertilidade do solo e deixar cultivares vulneráveis ao ataque de patógenos. Em um estudo com trigo cultivado em

climas áridos focado no estresse causado pela salinidade e ataque de fitopatógenos, no caso *Fusarium pseudograminearum*, foi utilizado *Trichoderma longibrachiatum* para induzir a resistência ao ataque de patógenos e tolerância ao sal (BOAMAH *et al.*, 2021).

1.2.1 Apicum e Salina

A transição entre os ambientes terrestre e aquático pode ser constituída por diferentes ecossistemas, entre os quais o manguezal se destaca por sua extensa distribuição ao longo do litoral brasileiro (ROVAL *et al.*, 2022). Adjacente a esse ecótono, encontra-se a área denominada Apicum, caracterizada por condições de hipersalinidade resultantes da inundação esporádica, que ocorre principalmente nas marés de sizígia (lua cheia e lua nova), associada a altas temperaturas que intensificam a evaporação e, conseqüentemente, elevam a concentração de sais (SANTOS, 2005). Nessas planícies hipersalinas, a vegetação é predominantemente herbácea, apresentando adaptações fisiológicas à elevada salinidade.

Em alguns apicuns, intervenções antrópicas, como a construção de contenções ou reservatórios modificam o regime natural de inundação, podem resultar na formação de salinas, áreas hipersalinas intensamente saturadas de sais (SANTOS, 2005). Elas podem ocorrer de forma natural ou serem criadas pelo homem, sendo utilizadas principalmente para atividades como carcinicultura (FERNANDES *et al.*, 2018), criação de camarões, e produção de sal. Assim, apicuns e salinas representam ecótonos dinâmicos que combinam características naturais e influências humanas, desempenhando papéis importantes tanto na ecologia costeira quanto nas atividades econômicas locais (DINIZ; VASCONCELOS; MARTINS, 2015).

1.3 Identificação taxonômica utilizando marcadores moleculares

Entender e explorar a rica biodiversidade fúngica passa por descobrir a identidade dos isolados, para isto, podem ser empregadas tanto técnicas clássicas quanto moleculares. As clássicas consistem em observações morfológicas em condições naturais ou em cultivo laboratorial, permitem observar diversidade de estruturas fúngicas, entretanto demandam tempo (GAUTAM *et al.*, 2022). Classificar espécies utilizando apenas morfologia requer expertise e mesmo assim especialistas enfrentam desafios quanto a espécies com alta semelhança morfológica, entretanto

geneticamente distantes, o que pode ter relação com casos de hibridação e evolução convergente (RAJA *et al.*, 2017). A utilização de técnicas moleculares, por sua vez, possibilita a identificação de uma grande quantidade de isolados de forma rápida, identificação de espécies não cultiváveis em laboratório (LIU *et al.*, 2025) e fornece dados mais robustos quanto à classificação a nível espécie. Levando em consideração a abundância fúngica, uma abordagem com múltiplos marcadores moleculares (ex. ITS, calmodulina e β -tubulina) é indicada, principalmente em estudos com fungos pertencentes a filos como Ascomycetos e Basidiomycetos, que possuem um grande número de gêneros e uma complexidade quanto à diversidade de espécies (TEKPINAR; KALMER, 2019).

1.3.1 ITS

A razão de sua aplicação em taxonomia vem da característica da região ITS (Figura 5) ser altamente variável entre espécies diferentes, mas relativamente conservada dentro de uma mesma espécie, o que facilita a discriminação taxonômica. Associado a isso, está a facilidade de amplificação por PCR utilizando primers universais (como ITS1 e ITS4). Por conta dessas características, este marcador se tornou popular para identificação taxonômica de fungos havendo uma grande quantidade de sequências ITS depositadas em bancos de dados públicos (GenBank, UNITE e MycoBank), o que permite a comparação e identificação taxonômica. O tamanho de amplicons esperado varia de $\pm$ 420 a 825 pb (MANTER; VIVANCO, 2007), variando de acordo com o filo. Também há diferenças entre linhagens devido ao acúmulo de mutações (SCHOCH *et al.*, 2012).

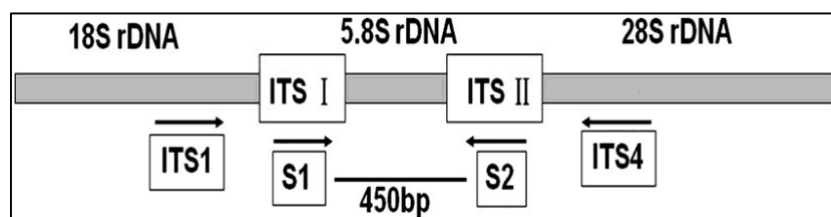


Figura 5 - Região região ITS localizada entre 18 rDNA e 28 rDNA (YANG *et al.*, 2017).

1.3.2 Calmodulina

A calmodulina é uma proteína de importância na regulação do metabolismo fúngico, como no crescimento micelial (MUTHUKUMAR; NICKERSON; NICKERSON,

1987), dimorfismo e regulação génica (DE CARVALHO *et al.*, 2003). É funcionalmente e estruturalmente conservada (SIMÃO; GOMES 2001). O marcador calmodulina geralmente é utilizado em associação a outros para identificação taxonômica de espécies crípticas, pertencentes a gêneros como *Aspergillus* (ALSHEHRI; PALANISAMY, 2019), *Fusarium* (MULÈ *et al.*, 2004; MONTOYA, GRIMALDO; GONZÁLEZ, 2024) e *Penicillium* (HOUBRAKEN *et al.*, 2012). O tamanho do amplicon esperado utilizando os primers de calmodulina (CaM5/CaM6) é de ~ 580 pb (KATATI *et al.*, 2024).

1.3.3 β -tubulina

A β -tubulina é uma subunidade proteica que faz parte da composição de microtúbulos que constituem o citoesqueleto, este responsável por importantes processos celulares, como divisão celular (SU *et al.*, 2024). Ao longo da evolução se dividiu em diferentes linhagens, o que deu origem a uma superfamília, o que é relevante em estudos sobre evolução de espécies (ZHAO *et al.*, 2014). É um marcador geralmente utilizado em conjunto com outros, indicado para análise filogenéticas mais profundas (EZEONUEGBU *et al.*, 2022). Indicado para gêneros como *Penicilum* (VISAGIE *et al.*, 2014), *Aspergillus* (SAMSON *et al.*, 2014) e *Scedosporium* (GILGADO *et al.*, 2005). O tamanho do amplicon utilizando os primers de β -tubulina (Bt2a/ Bt2b) é $\pm$ 550 pb (YIN *et al.*, 2017).

1.4 Ligninas Industriais

A lignina Kraft é um subproduto da produção de polpa de celulose a partir de madeira, sendo que em 2018 foi estimada a produção de 265 mil toneladas (DESSBESELL *et al.*, 2020). Ela é obtida nas indústrias de papel pelo cozimento dos cavacos de madeira com uma solução aquosa de hidrossulfeto de sódio e hidróxido de sódio que permite a liberação da lignina da estrutura da lignocelulose (BILAL *et al.*, 2021). O processo ocorre sob um elevado pH e resulta em um licor negro, composto de moléculas de diferentes tamanhos solúveis em soluções alcalinas, este é precipitado em um processo de acidificação e da origem a lignina Kraft (IRAM; BERENJIAN; DEMIRCI, 2021).

O processo organosolv origina uma lignina mais pura, livre de enxofre e que apresenta baixa solubilidade em água, porém tem baixo rendimento (PAROT;

RODRIGUES; STEVANOVIC, 2022). A lignina organosolv é obtida pelo tratamento de cavacos de madeira com solventes orgânicos, como ácido acético, a condições de temperatura e pressão elevadas (BALK *et al.*, 2023). Atualmente, a maior parte da lignina liberada pelo tratamento da biomassa lignocelulósica, tem como destinação a incineração para geração de energia, sendo o seu aproveitamento para obtenção de produtos de valor agregado bem pequeno (SHOREY *et al.*, 2024).

1.5 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos, como catecol, ácido vanílico e ácido 4 hidroxibenzoico, estão presentes em plantas, podendo ser produzidos através do metabolismo secundário. Abrigam classes variadas de compostos como isoflavonas, ancitocinas, flavonóides e ácidos hidroxibenzoicos. Este último grupo possui famílias de compostos derivados do ácido benzoico, com estruturas gerais C₆–C₁, sendo que alguns deles (ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico) estão presentes na estrutura da lignina (MURKOVIC, 2003) Durante a desconstrução desta por meio de reações catalisadas por enzimas, eles são liberados. A capacidade de alguns microrganismos em metabolizar tais compostos é valiosa na utilização da lignina (ALI *et al.*, 2024). Além de auxiliar a processos mais limpos, pode também dar origem a produtos de valor agregados, como o álcool veratrílico gerado pela metabolização de vanilina (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2023).

1.5.1 Catecol

O catecol (1,2-diidroxibenzeno) é um composto fenólico que pode ser obtido durante a desconstrução da lignina, a partir de diferentes precursores como ácido vanílico e ácido p-hidroxibenzoico (KUTRAITE; AUGUSTINIENE; MALYS, 2025). A abertura de seu anel aromático ocorre por duas rotas metabólicas: via orto (catecol 1,2-dioxigenase), tendo como produto cis,cis-muconato (GUZIK *et al.*, 2013), e via meta (catecol 2,3-dioxigenase), produzindo 2-hidroximuconato semialdeído (BAI *et al.*, 2021). Pode ser um contaminante em ambientes aquáticos, afetando negativamente as comunidades microbianas devido a toxicidade do composto que pode comprometer a integridade celular de organismos (CHEN *et al.*, 2022). Em contraste a esse aspecto, pode ser utilizado em aplicações medicas como produção de biomateriais, ex. bioadesivo aplicado para cicatrização rápida (WANG *et al.* 2022).

1.5.2 Ácido 4 hidroxibenzoico

O ácido 4 hidroxibenzoico pertence ao grupo dos ácidos benzoicos, é um dos principais derivados de lignina. Com propriedades como atuação antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, em plantas pode atuar na defesa contra patógenos (MANUJA *et al.*, 2013). Em fungos, seu catabolismo ocorre principalmente pela ação de hidroxilases, que o convertem em ácido protocatecuico, seguido pela abertura do anel aromático por dioxigenases. Esses processos direcionam o composto para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), por meio de intermediários como catecol e protocatecuato (KUTRAITE; AUGUSTINIENE; MALYS, 2025).

1.5.3 Ácido vanílico

O ácido vanílico, ou ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico, é um intermediário na produção de vanilina, no processo de desconstrução de lignina pode ter como precursor o ácido ferúlico (REJANI; RADHAKRISHNAN, 2020). Com propriedades antioxidantes e antifúngicas (KHAN *et al.*, 2024), também é utilizado como aromatizante (KAUR *et al.*, 2022).

1.6 Enzimas lignolíticas

As enzimas produzidas por fungos filamentosos halófilos apresentam estabilidade funcional em condições extremas que normalmente inativariam outras enzimas, como a presença de solventes orgânicos (DASSARMA; DASSARMA, 2015). Essa resistência, associada à adaptabilidade a amplas variações de pH e temperatura, torna essas enzimas altamente promissoras para aplicações industriais (SLIZEWSKA; SWITA; MIKOŁAJCZYK, 2023). Além disso, microrganismos halófilos capazes de desconstruir a lignina podem ser valiosos, pois alguns processos industriais a partir de biomassa lignocelulósica ocorrem sob condições extremas de temperatura e com concentrações elevadas de sal, como é o caso da produção de biocombustíveis (AMOOZEGAR *et al.*, 2019).

1.6.1 Lacases

Lacases são enzimas que pertencem à família das multicobre oxidases (Lac, EC 1.10.3.2), sendo classificadas no banco de dados Cazy (*Carbohydrate-Active*

Enzymes) como AA1 (*Auxiliary Activities* 1). São largamente utilizadas pela ampla distribuição na natureza e capacidade de atuar sobre compostos fenólicos e polímeros aromáticos (ALGUSTIN *et al.*, 2021). Possuem quatro átomos de cobre organizados em três tipos de centros (T1, T2 e T3), responsáveis pela transferência de elétrons: o substrato doa elétrons ao T1, que os transfere ao centro T2/T3, onde o O₂ é reduzido a duas moléculas de H₂O (MEHRA *et al.*, 2018).

As lacases podem ser produzidas por diferentes organismos. Plantas podem utilizá-las na síntese de lignina, enquanto fungos (ex.: *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium*) as usam para desconstruir este heteropolímero (ARREGUI *et al.*, 2019; TIŠMA *et al.*, 2021; AKBAR ALY; SHANMUGARAJ; RAMALINGAM, 2025). Conseguem interagir com uma alta variedade de substratos e não apenas com aqueles com afinidade específica. Logo, possuem aplicabilidades diversas como: melhora da digestibilidade de ruminantes (KUMAR; SRIDHAR; RAO, 2022) e branqueamento nas indústrias de papel (SINGH; ARYA, 2019) e têxtil (XU *et al.* 2024), geralmente produzidas por fungos da podridão branca, como *Pleurotus ostreatus* (ELSHAFEI *et al.*, 2025).

1.6.2 Manganês peroxidases

Manganês peroxidases são enzimas da classe das oxidoredutases (MnP, EC 1.11.1.13) dependentes de Mn²⁺, catalisando sua oxidação a Mn³⁺, e possuem o grupo protético heme no sítio catalítico. São capazes de degradar compostos com estruturas complexas, como poluentes orgânicos aromáticos e derivados da lignina (BILAL *et al.*, 2023). Essas enzimas utilizam peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como cofator, o qual se liga ao ferro na forma Fe³⁺ para iniciar a reação. Nessa etapa, a manganês peroxidase (MnP) é oxidada, formando o composto MnP I e liberando água (H₂O) (ZHAO *et al.*, 2022). Em seguida, o íon Mn²⁺ é oxidado a Mn³⁺, resultando na formação do composto MnP II. Por fim, MnP é reduzida e retorna ao seu estado original, completando o ciclo catalítico (ZHAO *et al.*, 2022). O fungo da podridão branca modelo na desconstrução de lignina *Phanerochaete chrysosporium* é eficiente na produção de MnP (KONAN *et al.*, 2024).

1.6.3 Dye-de decolorizing peroxidases

São heme peroxidases (Dyp, EC 1.11.1.19) que podem ser utilizadas em diferentes indústrias para tratar efluentes tóxicos, como corantes têxteis e provindos de indústrias alimentícias (SILVA *et al.*, 2023). Utilizam peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons para formação do composto I, que em seguida oxida o substrato para formação do composto II, este é reduzido e se tem o retorno ao estado de relaxamento da enzima (PUPART *et al.*, 2024). Um exemplo de seu potencial foi demonstrado por SUGANO *et al.* (2000), que relataram um aumento de 42 vezes na atividade enzimática de uma DyP nativa de *Geotrichum candidum* Dec 1 quando expressa em vetor de *Aspergillus oryzae* M-2-3. No isolamento original, em *G. candidum* Dec 1, foi detectada a capacidade de degradar 21 tipos de corantes sintéticos.

1.6.4 Peroxidases versáteis

São heme peroxidases (VP, 1.11.1.16) que por possuir uma atividade promíscua podem atuar em um amplo espectro de compostos, como pesticidas, lignina e compostos não fenólicos (BARBER-ZUCKER *et al.*, 2022). Os três sítios catalíticos com diferentes intermediários permitem um potencial redox variado, o que é interessante para aplicações biotecnológicas. Outra característica que as tornam atraentes é a capacidade de atuação em diferentes pHs; são capazes de atuar em pHs ácidos e podem ser modificadas para atuarem em condições alcalinas (PEREZ *et al.* 2016). Um exemplo de fungo capaz de produzir VP é o fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus* é (AMBATKAR *et al.*, 2022).

1.6.5 Lignina peroxidases

Lignina peroxidases (LiP, EC 1.11.1.14) possuem alto poder redox clivando ligações carbono-carbono (C-C) e éter C-O-C. São oxidoredutases, possuindo grupo prostético heme (WANG *et al.*, 2023). Podem atuar na descoloração de melanina, oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos (SINGH *et al.*, 2021). Catalisam reações na presença de H_2O_2 , que oxida a enzima e leva à formação do composto I. Este é reduzido por uma molécula de substrato ao composto II, o qual, por sua vez, recebe um elétron de outra molécula de substrato e retorna ao estado de repouso (FALADE *et al.*, 2017). Em estudo conduzido por Dinh Giap *et al.* (2022), o fungo de

podridão branca *Lentinus squarrosulus* MPN12 apresentou atividade promissora na degradação de corantes, e a análise por FTIR indicou também potencial para a desconstrução da lignina.

1.7 Bioprodutos de Lignina

A caracterização de bioprodutos quanto à sua estrutura e concentração pode ser realizada por meio de diversas técnicas cromatográficas e espectroscópicas. A cromatografia é uma técnica analítica que possibilita a separação, identificação e purificação de analitos com base em diferentes princípios, como tamanho molecular ou afinidade química, utilizando uma fase móvel e uma fase estacionária (DEBNATH *et al.*, 2025). A escolha do tipo cromatográfico varia conforme as características específicas da amostra a ser analisada. Essa técnica é amplamente empregada na indústria farmacêutica para controle de qualidade e análise de compostos bioativos (BHATI *et al.*, 2022).

A cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) se baseia na separação de compostos através de uma fase estacionária, composta normalmente por uma coluna com partículas porosas, e uma móvel, constituída por uma mistura de solventes (GUMUŁKA *et al.*, 2022). A utilização de partículas ultrafinas na fase estacionária permitiu a melhora da técnica que passou a ser mais sensível, ter resolução melhor e consumir menos solvente, o que contribui para sustentabilidade (EL-RAHMAN *et al.*, 2020). Quando acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA), adquire sensibilidade de detecção. Esse detector se baseia na absorção de luz ultravioleta ou visível e emissão por compostos que possuem grupos cromóforos, que são compostos capazes de absorver luz e liberar, ele funciona na faixa de 190 a 500 nm (IRAM *et al.*, 2018).

Essas técnicas são importantes na identificação de bioprodutos gerados durante a desconstrução e bioconversão da lignina por fungos (Tabela 1). Alguns exemplos de bioprodutos com potencial biotecnológico que podem ser interessantes para aplicações industriais são: biomoléculas de valor agregado (ex.: vanilina e ácido protocatecuico) e bioinsumos.

Tabela 1 – Exemplos de bioprodutos de lignina ou derivados de lignina relatados na literatura relacionados fungos filamentosos.

Fungo	Bioproduto	Substrato	Referências
<i>Aspergillus Niger</i>	Vanilina e 6,7-dihydroxy 4-methylcoumarin	Lignina kraft	VIRMANI, S., <i>et al.</i> Lignin degradation by isolated lignolytic <i>Acinetobacter baumannii</i> S2, <i>Aspergillus niger</i> SF4 and <i>Rhodotorula glutinis</i> and profiling products from bio-valorization perspective. Waste Biomass Valor , v. 15, p. 101–114, 2024.
	Ácido vanílico	Ácido ferúlico	REJANI, C. T.; RADHAKRISHNAN, S. Microbial conversion of vanillin from ferulic acid extracted from raw coir pith. Nat Prod Res. , v. 36, n. 4, p. 901–908, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1849194 >
<i>Aspergillus niger I-1472</i>	Ácido ferulico, ácido vanílico e vanilina	Casca e coroa do abacaxi	TANG, P. L.; HASSAN, O. Bioconversion of ferulic acid attained from pineapple peels and pineapple crown leaves into vanillic acid and vanillin by <i>Aspergillus niger</i> I-1472. BMC Chem. , v. 14, n. 1, p. 7, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1186/s13065-020-0663-y >.
<i>Trichoderma sp.</i>	Ácidos: vanílico, p-hidroxibenzoico e siríngico. Aldeídos: p-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído.	Efluentes gerados na precipitação química de lignina	BOHACZ, J.; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T., Modification of post-industrial lignin by fungal strains of the genus <i>Trichoderma</i> isolated from different composting stages. Journal of Environmental Management , v. 266, 110573, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110573 >.
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> MUCL39533	Vanilina cristalina	Ácido ferúlico	LESAGE-MEESSEN, L.; LOMASCOLO, A.; BONNIN, E. <i>et al.</i> A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. Appl Biochem Biotechnol , v. 102, p. 141–153, 2002. Disponível em: < https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:141 >.

<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Vanilina	Ácido vanílico	REJANI, C. T.; RADHAKRISHNAN, S. Microbial conversion of vanillin from ferulic acid extracted from raw coir pith. Nat Prod Res. , v. 36, n. 4, p. 901–908, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1849194 >
<i>Aspergillus ochraceus</i> DY1	Ácido n-hexadecanóico, octadecano, butil-hidroxitolueno, 2,6,11-trimetil-dodecano, dibutil ftalato, ácido oleico, acetato de 3,5-dimetoxi-fenol e 2-(fenilmetileno)-ciclohexanona	Lignina alcalina	NILZA, N.; PRASAD, R.; VARMA, A.; SALAM, M. D. Deconstruction of alkali lignin and lignocellulosic substrates by <i>Aspergillus ochraceus</i> DY1 isolated from rotten Wood. J Fungi (Basel) , v. 10, n. 12, p. 810, 2024. Disponível em: < https://doi.org/10.3390/jof10120810 >.
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodan</i>	Bagaço de cana de açúcar	ABDESHAHIAN, P. <i>et al.</i> Fermentative production of Lasiodiplodan by <i>Lasiodiplodia Theobromae</i> CCT3966 from pretreated sugarcane Straw. Sustainability , v. 13, p. 9697, 2021. Disponível em: < https://doi.org/10.3390/Su13179697 >.
<i>Phomopsis liquidambari</i>	cis, cis -mucônico	Ácido 4-hidroxibenzóico e ácido ferúlico	CHEN, Y.; PENG, Y.; DAI, C.; JU, Q. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by <i>Phomopsis liquidambari</i> , Applied Soil Ecology , v. 51, p. 102-110, 2011. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.004 >. XIE, X. G.; DAI, C. C. Degradation of a model pollutant ferulic acid by the endophytic fungus <i>Phomopsis liquidambari</i> . Bioresource Technology , v. 179, p. 35-42, 2015. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.112 >.
<i>Schizophyllum commune</i>	Ácido vanílico	Ácido ferúlico	GHOSH, S.; SACHAN, A.; MILTRA, A. Degradation of ferulic acid by a white rot fungus <i>Schizophyllum commune</i> . World J Microbiol Biotechnol , v. 21, p. 385–388, 2005. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/s11274-004-3621-2 >.

<i>Aspergillus luchuensis</i>	Ácido ferúlico, vanilina e ácido vanílico	Koji de arroz	TAIRA, J.; TOYOSHIMA, R.; AMEKU, N. <i>et al.</i> Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, <i>Aspergillus luchuensis</i> . AMB Expr , v. 8, p. 40, 2018. Disponível em: < https://doi.org/10.1186/s13568-018-0569-4 >.
<i>Coriolus versicolor</i>	Hidrogéis aniônicos	Lignina Kraft	BRZONOVA, I.; KOZLIAK, E. I.; ANDRIANOVA, A. A. <i>et al.</i> Production of lignin based insoluble polymers (anionic hydrogels) by <i>C. versicolor</i> . Sci Rep. , v. 7, p. 17507, 2017. Disponível em: < https://doi.org/10.1038/s41598-017-17696-1 >.
<i>Obba rivulosa</i>	Fibras precursoras	Lignina Kraft	MIKKILÄ, J.; TROGEN, M.; KOIVU, K. A. Y. <i>et al.</i> Fungal treatment modifies kraft lignin for lignin- and cellulose-based carbon fiber precursors. ACS Omega , v. 5, n. 11, p. 6130-6140, 2020. Disponível em: < https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00142 >.

1.7.1 Vanilina

Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um aldeído aromático amplamente utilizado na indústria alimentícia em todo mundo, ele dá o característico sabor e aroma de baunilha. Naturalmente é proveniente de algumas plantas, como *Vanilla orchids*. Porém, a alta demanda da indústria alimentícia torna inviável a utilização apenas de vanilina extraída de plantas e a síntese química se torna necessária, o que não é uma alternativa sustentável (XU *et al.*, 2024).

Fungos, como *Penicillium* e *Aspergillus*, podem produzir esse composto em seu metabolismo a partir de diferentes fontes de carbono, como biomassa vegetal, que utilizam para obtenção de ácido ferúlico que é transformado em vanilina (D'ARRIGO *et al.*, 2024). Logo, representam uma opção que pode contribuir com a produção mundial de forma a diminuir os impactos ambientais da produção e custos (MA *et al.*, 2022).

1.7.2 Ácido protocatecuico

Ácido protocatecuico é um ácido fenólico encontrado em plantas e que pode ser produzido por fungos, ele possui propriedades interessantes a indústria farmacêutica, como anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (SONG *et al.*, 2020). Também pode ser precursor de outros compostos, como vanilina e ácido mucônico cis-cis. Na literatura tem relatado a produção de ácido protocatecuico a partir de ácido cafeico, um ácido hidroxicinâmico, por *Aspergillus niger* (LUBBERS *et al.*, 2021).

1.7.3 Bioinsumos agrícolas

Bioinsumos constituem uma ampla classe de produtos direcionados à produção agrícola e podem ser aplicados com diferentes propósitos, incluindo os bioestimulantes, que quando aplicados diretamente às plantas ou à rizosfera promovem melhorias no desenvolvimento vegetal (BARBOSA *et al.*, 2025). Esses insumos têm origem em processos biológicos ou em produtos derivados de recursos naturais. Dentre as diferentes fontes, fungos endofíticos destacam-se por estabelecerem relações simbióticas harmoniosas com as plantas, secretando

metabólitos capazes de modular o crescimento e induzir respostas benéficas (YOUNAS; YOUNAS, 2025). Entre esses compostos encontram-se os fitohormônios, que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento vegetal. Um exemplo é o ácido indol-3-acético (AIA), produzido por fungos, que estimula o crescimento de raízes e, conseqüentemente, aumenta a absorção de nutrientes (FU *et al.*, 2015). Como aplicação prática, destaca-se o bioinoculante Rootella® BR, formulado a partir do fungo micorrízico arbuscular *Rhizogloium intraradices*, que promove a expansão do sistema radicular e melhora a eficiência na absorção de nutrientes (MEYER *et al.* 2024; ONYEAKA *et al.*, 2024).

2 OBJETIVO GERAL

Isolar fungos halófilos ou halotolerantes que utilizam lignina como única fonte de carbono a partir da biodiversidade microbiana de ambiente hipersalino e testar sua capacidade de conversão de lignina em bioprodutos de interesse econômico.

2.1 Objetivos específicos:

- Obter uma coleção de microrganismos provenientes de ambiente salino capazes de utilizar lignina como única fonte de carbono;
- Realizar a identificação taxonômica dos isolados fúngicos utilizando técnicas moleculares;
- Buscar na literatura aplicações biotecnológicas para os fungos encontrados;
- Crescer os isolados fúngicos em meios sólidos contendo ligninas industriais, Kraft e organosolv, (que contêm contaminantes) e monômeros fenólicos (ácido vanílico, catecol e ácido 4 hidroxibenzóico) como única fonte de carbono;
- Avaliar isolados fúngicos de ambiente hipersalino quanto à atividade enzimática de lacase em diferentes tempos (10, 15, 20, 25 e 30 dias);
- Avaliar por meio de cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) a capacidade de diferentes isolados fúngicos de consumir lignina em diferentes tempos (7, 15, 30 e 45 dias);
- Avaliar por meio de UPLC se há produtos gerados por isolados fúngicos selecionados a partir da lignina em diferentes tempos (7, 15, 30 e 45 dias);

- Determinar se alguma das biomoléculas produzidas a partir de lignina possui potencial industrial;
- Avaliar especificamente o potencial de produção de fitohormônios por UPLC, acoplado a um espectrômetro de massas (UPLC-MS).

3 JUSTIFICATIVA

Microrganismos estão presentes ubiquamente desempenhando papel de relevância no equilíbrio ecológico, desde a decomposição de matéria orgânica, até mesmo sendo indicativos para problemas ambientais. A exploração do potencial biotecnológico dos microrganismos tem se destacado como uma fonte valiosa para a produção de diversos bioprodutos de interesse econômico, incluindo biocombustíveis, fármacos, insumos para a indústria alimentícia e bioinsumos agrícolas.

Nesse contexto, fungos representam a maior diversidade eucariótica da Terra, estimando-se que existam entre 2 a 11 milhões de espécies, das quais cerca de 150.000 foram identificadas (PHUKHAMSAKDA *et al.*, 2022). Apesar de sua ampla distribuição e atuação em diferentes bioprocessos, ainda há muito a ser elucidado sobre o envolvimento que possuem na desconstrução biológica de lignina. A bioconversão da lignina por fungos em produtos de valor agregado poderá contribuir para o aumento da eficiência de processos que utilizam biomassa lignocelulósica, além da geração de produtos da economia circular.

Uma coleção de fungos provenientes de ambiente salino apresenta elevado potencial para a geração de bioprodutos, uma vez que esses microrganismos desenvolvem adaptações específicas para sobreviver a condições de estresse ambiental. Tais adaptações favorecem a produção de metabólitos secundários e enzimas com estabilidade frente a variações de temperatura e pH (YOVCHEVSKA *et al.*, 2025). Quando essa capacidade é aliada ao potencial de desconstrução biológica da lignina, ampliam-se as possibilidades de aplicação biotecnológica, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos produtos.

4 Material e Métodos

4.1 Coleta, processamento e isolamento a partir das amostras de liteira Salina e Apicum

Neste projeto foram adotadas duas estratégias para obtenção de fungos filamentosos: plaqueamento direto e cultura de enriquecimento. Por não serem o foco dessa dissertação, bactérias ou leveduras (53) obtidas no processo foram armazenadas no -80 °C para outras utilizações futuras do grupo de pesquisa (Anexo 10).

As amostras de liteira foram coletadas pelo pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros Dr. Marcelo Fernandes, em diferentes pontos na região do estuário do rio Vaza Barris no Estado do Sergipe (Figura 6). A coleta foi realizada em 2023, o mês de coleta foi agosto e este foi um mês chuvoso na região de Itaporanga D'Ajuda - SE.



Figura 6 - Imagens da região de coleta das amostras. (Autor: FERNANDES, M. F., 2023).

Foram coletadas amostras de liteira em duas áreas distintas, denominadas Salina e Apicum, 12 pontos de cada área, totalizando 24 pontos. As amostras coletadas nos diferentes pontos foram homogeneizadas para compor uma amostra principal (liteira) de cada uma das áreas. As amostras compostas resultantes foram denominadas: Liteira Salina e Liteira Apicum. O pH dos pontos de coleta de onde as liteiras estavam depositadas foi medido e o georreferenciamento realizado. Sendo da Liteira Apicum a localização 11°5'53,86" S e 37°11'23,44" W e da Liteira Salina a localização 11°6'01,56" S e 37°11'7,56" W (Figura 7).

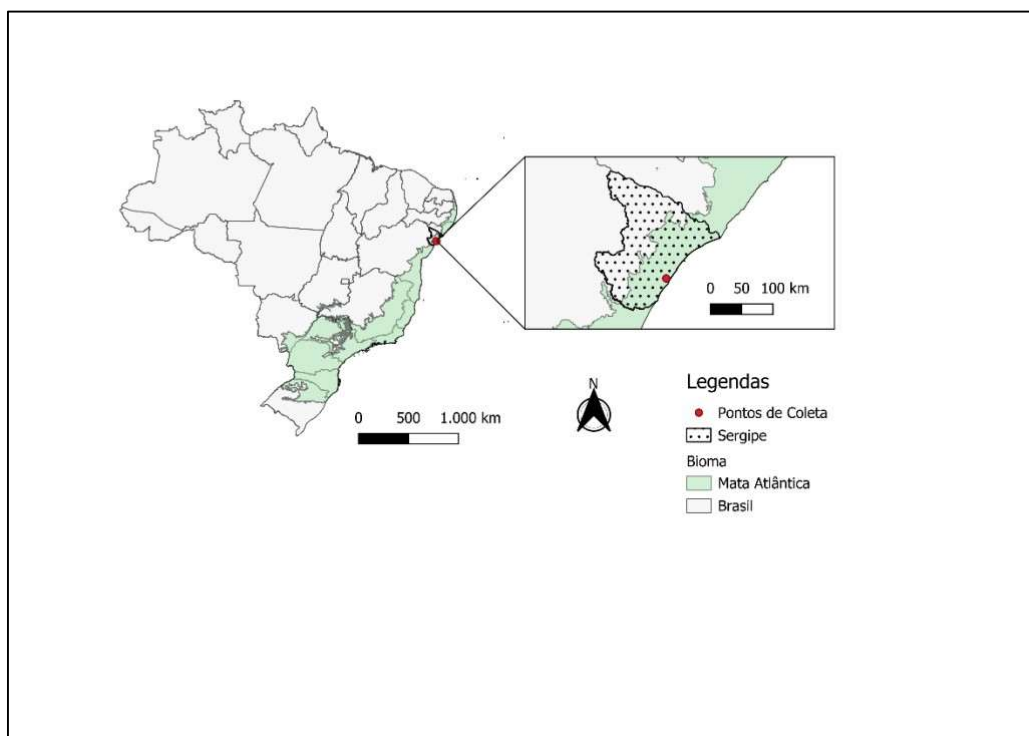


Figura 7 - Mapa do Brasil destacando as coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras (11°5'53.86" S, 37°11'23.44" W) (11°6'01.56" S, 37°11'7.56" W). O estado de Sergipe está com uma marcação hachurada, local de origem das amostras.

As amostras de liteiras foram trituradas com solução salina em um liquidificador. Para liteira Apicum utilizou-se solução salina a 4,5 % (m/v) e para Salina a 11 % (m/v). Uma parte da mistura resultante após o tritramento de cada amostra foi utilizada para plaqueamento direto e a outra para o experimento de enriquecimento (Figura 8). Foram plaqueados 1 mL das diluições de 10^{-1} e 10^{-2} em cada placa de petri de 150 x 90 mm. As placas foram incubadas em uma estufa a 28 °C. Os meios de cultivo utilizados foram: M9, Mandels's & Weber (MANDELS; WEBER, 1969), Czapek (Anexo 1), modificados para conter Kraft Sigma Aldrich 471003 como única fonte de carbono e tiveram versões com 4,5 % (m/v) de NaCl, 11% (m/v) e sem NaCl (Tabela 2).

Tabela 2 - Meios de cultura usados para isolamento de microrganismos modificados para terem lignina kraft como única fonte de carbono a 0,1 e 1 % (m/v) e alguns com adição de cloreto de sódio a 4,5 e 11 % (m/v).

Meio	Lignina Kraft (m/v) %	NaCl (m/v) %	Amostra
M9	1,0	0,0	Liteira Apicum e Salina
M9	0,1	4,5	Liteira Apicum
M9	0,1	11,0	Liteira Salina
CZAPEK	1,0	0,0	Liteira Apicum e Salina
CZAPEK	0,1	4,5	Liteira Apicum
CZAPEK	0,1	11,0	Liteira Salina
Mandel's & Weber	1,0	0,0	Liteira Apicum e Salina
Mandel's & Weber	0,1	4,5	Liteira Apicum
Mandel's & Weber	0,1	11,0	Liteira Salina

Para o experimento de enriquecimento da cultura foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, cada um com 50 mL de meio e a adição de 2 mL das diluições realizadas com as amostras das Liteiras Apicum e Salina em soluções salinas. As condições de cultivo no shaker foram: 37 °C a 200 rpm. A cada duas semanas uma passagem era realizada e 2 mL do inóculo cultivado era colocado em um Erlenmeyer com meio estéril e as mesmas condições de cultivo eram repetidas. Foram realizadas seis passagens e depois plaqueamento, seguindo os meios originais para isolamento de microrganismos.

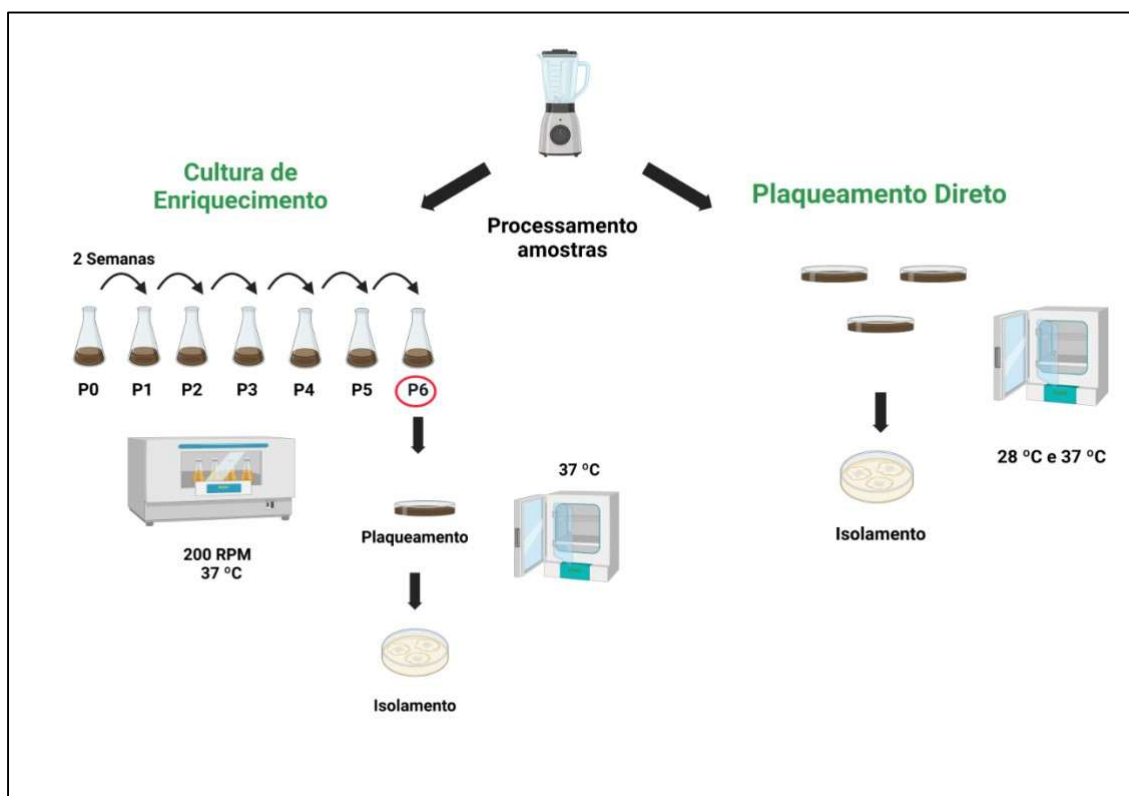


Figura 8 Esquema detalhando os experimentos de plaqueamento direto e cultura de enriquecimento. Criado pelo Biorrender.

4.2 Isolamento fungos filamentosos e obtenção de culturas puras

A partir das placas com os inóculos iniciais com as diluições das amostras (10^{-1} e 10^{-2}) foram realizadas as técnicas de *single spore* e *hyphal tip* para obtenção de culturas fúngicas puras (MELLO; SILVA, 2011). Para os isolados de aspecto mais esporulante (Anexo 9) foi empregada a técnica de *single spore* (CHOI; HYDE; WELLCOME, 1999). Para isto foi feita a adição de 2 mL de 0,1% (v/v) Tween 80 à placa com o isolado de fungo, depois esta foi raspada, evitando levar pedaços do meio junto com ao raspado. O conteúdo raspado foi adicionado a um tubo Falcon de 50 mL contendo 0,1% (v/v) Tween 80 e foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em 0,1% (v/v) Tween 80. Foi realizado um inóculo de 100 μ L utilizando a alça de Drigalski em placas com meio de cultura de acordo com a placa do primeiro isolamento de cada isolado. As placas foram incubadas a 28 °C e observadas até o surgimento de uma pequena colônia fúngica. Posteriormente esta foi repassada para outra placa individual.

Para os demais isolados (Anexo 9) foi realizada a técnica de *hyphal tip*, na qual a parte mais ativa do crescimento fúngico que fica localizada nas bordas é transferida

para uma placa com meio fresco (LEYRONAS; DUFFAUD; NICOT, 2012). Para a transferência foram cortados plugs do crescimento fúngico da borda de cada colônia com ponteira p1000 e colocados ao centro de cada placa (FUSARO, 1972).

Cada isolado passou por três passagens que foram realizadas a cada 7 dias, em placas individuais para individualização dos fungos. Depois para todos isolados foi utilizada a técnica de semeadura do ponto central para transferência de meios de cultura durante a realização de estoques (MOTTA *et al.*, 2008). Foi utilizado um palito de dente estéril para coletar uma pequena parte do fungo e depois perfurar levemente o meio de cultura no centro da placa (MOTTA *et al.*, 2008). Os isolados foram cultivados em 4 placas para o estoque, estas deveriam apresentar morfologia final similar entre as placas para garantir a pureza do isolado.

4.3 Isolamento de bactérias ou leveduras

Para as bactérias ou leveduras foi usado o método de single colony (HILDEBRAND, 1938). Em cada passagem uma colônia era escolhida, tocada com uma ponteira p200 e estriada em uma placa individual com meio de origem com lignina como única fonte de carbono. Foram feitas três passagens para obtenção de colônias puras.

4.4 Estoque de fungos filamentosos

Os estoques de fungos filamentosos foram feitos de duas formas: em glicerol 20 % (v/v) no ultrafreezer (UZUNOVA-DONEVA; DONEV, 2005) e *Castellani* (CASTELLAN, 1967). A primeira ocorreu da seguinte forma: com auxílio de uma ponteira P1000 estéril, discos da placa em que o fungo foi cultivado por duas semanas foram cortados. Foram escolhidas regiões da extremidade do crescimento micelial, para obtenção de um material com crescimento fúngico mais recente. Os discos foram colocados com a parte que contém o fungo virado para baixo nos criotubos contendo glicerol 20 % e armazenados em ultrafreezer a - 80 °C.

Para o estoque em *Castellani* foram cortados discos com ponteira P1000 estéril da placa com o fungo cultivado. Os discos foram colocados de forma que a parte com o fungo cultivado estava posicionada para baixo no tubo de 4,5 mL contendo água destilada estéril. Durante a adição de cada novo disco, tomou-se o cuidado de evitar

a formação de bolhas e de assegurar que a porção do fungo cultivado permanecesse em contato exclusivamente com o meio do disco subjacente. Ao término do procedimento, verificou-se que a água no interior do tubo recobria integralmente os discos. As amostras foram então armazenadas à temperatura ambiente.

4.5 Extração de DNA de fungos filamentosos

Para extração de DNA de fungos filamentosos foi utilizado um protocolo baseado em RAEDER & BRODA, 1985. Primeiro os fungos foram cultivados em Falcons de 50 mL (Figura 9) com 15 mL de Caldo *Sabouraud* por 5 dias. Os micélios foram filtrados usando um filtro acoplado a bomba a vácuo. Os micélios resultantes foram colocados em graus de porcelana e macerados com nitrogênio líquido até se tornarem pó. Este foi transferido para microtubos de 2 mL contendo tampão de extração (Anexo 2). Os microtubos foram incubados em um termomixer a 65 °C por 1 h, sob uma agitação de 700 rpm. Em cada microtubo adicionou-se 0,7 µL de RNase A (20 µg/mL). Estes foram incubados em um termobloco a 37 °C por 1 h. Na capela de exaustão foi colocado 1 mL de fenol equilibrado em cada microtubo. Depois foram centrifugados por 10 minutos sob rotação de $12.000 \times g$ a 4°C.

O sobrenadante (fase aquosa) foi coletado e transferido para um novo microtubo de 2 mL e depois adicionou-se 900 µL de uma mistura de fenol e clorofórmio 1:1 (v/v) (450 µL de fenol + 450 µL de clorofórmio). Depois foram centrifugados por 10 minutos, sob rotação de $12.000 \times g$ a 4 °C. Nos casos em que se constatou resíduos visíveis de celulases/proteínas entre as fases aquosa e fenólica o procedimento foi repetido para um resultado livre de contaminação por proteínas.

O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos de 2 mL e depois adicionou-se 900 µL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v). Depois foram centrifugados por 10 minutos sob rotação de $12.000 \times g$ a 4°C. Foi coletado o sobrenadante e 0,6 volumes de isopropanol adicionados, misturou-se por inversão os microtubos. Eles foram incubados durante a noite no freezer a -20 °C e centrifugados por 30 minutos a $12.000 \times g$ a 4 °C.

O álcool foi descartado e o pellet formado foi lavado com 400 µL de etanol 70% (v/v) para remover sais. Os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a $12.000 \times g$. O etanol foi descartado e os microtubos foram colocados para secar *over night* em

cima da bancada. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura.

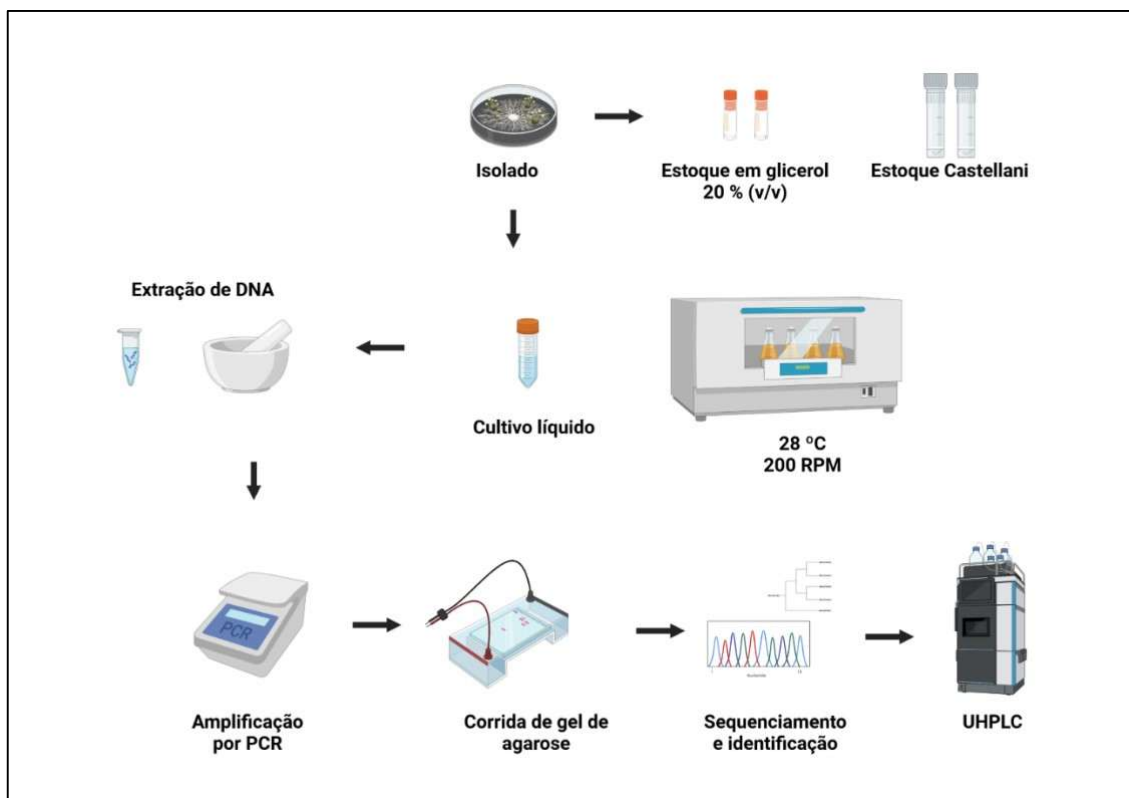


Figura 9 - Etapas de extração de DNA genômico, amplificação de região ITS por PCR, sequenciamento das regiões amplificadas, identificação e posteriormente utilização do UPLC. (Criada pelo Biorrender).

4.6 PCR para amplificação das regiões ITS 1 e ITS 4 e purificação do amplicon

Para a reação de PCR foram pipetados: 4 µL de cada primer 10 µM, 0,4 µL de dNTPs 0,2 mM, 0,3 µL da Taq polimerase Cellco 1 U/ µL, 5 µL de tampão PCR buffer 1X e 7,4 µL de MgCl₂ 25 mM. O volume final da reação foi de 50 µL. Os primers utilizados foram ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE *et al.*, 1990), que são iniciadores universais para amplificação da região ITS.

Em um termociclador, a amplificação se deu sob as seguintes condições: desnaturação por 4 min. a 95 °C, depois 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s. a 72 °C de anelamento e por fim extensão por 10 min. a 72 °C. A amplificação foi confirmada por meio de eletroforese com gel de agarose a 0,8% (m/v) que correu por 1 h a 80 V e se utilizou um marcador de corrida de 1 kb (Apêndice A). Por fim, os fragmentos amplificados no tamanho esperado e visualizados no gel de

agarose foram purificadas utilizando o Kit GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante e quantificadas com o equipamento NANODROP ONE (Thermo Scientific).

4.7 Identificação taxonômica molecular

As sequências providas do sequenciamento de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), realizado pela Empresa CliniLab (Bahia, Brasil), foram inseridas no programa Bioedit 7.2, onde foi possível ver a qualidade do sequenciamento por meio dos cromatogramas gerados (Figura 10). As sequências *forward* e *reverse* de cada amostra foram inseridas no programa Bioedit, removendo as extremidades que não possuíam uma boa qualidade para ser utilizada na análise. As sequências consensus foram invertidas para formar uma fita complementar (contig). Os contigs gerados foram contrastados com os programas UNITE (Disponível em: < <https://unite.ut.ee/analysis.php> >), Mycobank (Disponível em: < https://www.mycobank.org/Pairwise_alignment >), estes são bancos de dados curados para fungos, e no GenBank (Disponível em: < https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome >). A sequências foram identificadas quanto a gênero e espécie com base no percentual de identidade e cobertura.



Figura 10 - Alinhamento de sequências *forward* e *reverse* utilizando o Bioedit 7.2.

A árvore filogenética foi construída usando o programa Mega 11.0.10 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021). As sequências foram alinhadas utilizando MUSCLE e foi construída uma árvore filogenética Neighbour Joining Tree, com Bootstrap de 1000 vezes (SAITOU; NEI, 1987).

4.8 Crescimento em ligninas industriais

Para o experimento foi escolhido o meio Mandel's & Weber (MANDELS; WEBER, 1969) (Anexo 1), com lignina como única fonte de carbono nas proporções de 1 e 0,5 % (m/v). Utilizou-se a lignina Kraft (Sigma Aldrich 471003) e ligninas industriais, Kraft e organosolv. Na condição de 0,2 % de lignina foi feita a adição de 2 % de NaCl. O cultivo foi feito em estufa a 28 °C.

O crescimento foi acompanhado e registrado através de um *heatmap* com notas de 0 a 5, sendo atribuído 0 para ausência de crescimento e 5 para o crescimento em totalidade na placa de petri 15 x 90 mm. As avaliações de crescimento foram feitas com 7, 15 e 30 dias.

4.9 Crescimento em compostos fenólicos derivados de lignina

O experimento foi realizado em colaboração com o Me. Mateus Florentino Barbosa. Foram utilizados 3 compostos aromáticos, a 20 mM cada, como fonte de carbono nos meios de cultura, sendo eles: ácido vanílico (SAFC® W398802), ácido 4 hidroxibenzóico (Acros Organics 120995000) e catecol (Acros Organics 158985000). O meio utilizado foi Mandel's & Weber (MANDELS; WEBER, 1969) (Anexo 1), para cada composto aromático foi feita uma versão do meio com NaCl a 2 % (m/v) e uma versão sem cloreto de sódio.

Após os meios ficarem prontos, os fungos estocados foram inoculados e colocados em estufa a 28 °C. Os crescimentos foram avaliados visualmente nos períodos de 7, 15 e 30 dias, com atribuições de 0 a 5 para a taxa de crescimento de cada isolado nos compostos aromáticos, por fim foi feito um *heatmap* para visualização dos resultados.

4.10 Cultivo em meio líquido Mandel's & Weber para indução enzimática de lacase

Para a indução enzimática, os isolados foram cultivados no meio líquido Mandel's & Weber (MANDELS; WEBER, 1969) (PELÁEZ *et al.*, 2022) com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft (Sigma Aldrich 471003) (SHIRAISHI *et al.*, 2021) e 0,5% (m/v) de glicose, uma fonte de carbono para estimular a produção de lacase e a outra para o aumento de biomassa, com 1,125 % de extrato de levedura (m/v) (SHIRAISHI *et al.*, 2021) e 1 mM de CuSO₄ (m/v) (GORALCZYK-BIŃKOWSKA *et al.*, 2019). As condições de cultivo no *shaker* foram 200 rpm a 28°C (SHIRAISHI *et al.*, 2021). Foram inoculados 4 plugs (5 mm de diâmetro contendo os fungos filamentosos) (SHIRAISHI *et al.*, 2021), provenientes de placas com meio sólido, Mandel's & Weber com 1 % de lignina Kraft e crescimento fúngico de duas semanas, em 50 mL de meio em erlenmeyer de 250 mL. Os isolados foram organizados em 5 blocos, cada um com 7 isolados, para a realização do experimento. Os sobrenadantes para os testes de atividade lacase foram coletados com 10, 15, 20, 25 e 30 dias. A cada dia de análise uma alíquota do crescimento era colhida, colocada em microtubo, então centrifugada a 10.000 × g por 10 min para separação do sobrenadante e este utilizado no ensaio enzimático.

4.10.1 Ensaio de atividade lacase com 2,6-dimetoxifenol

O método utilizado para detecção de atividade lacase foi baseado naquele descrito por de EDENS, GOINS *et al.* (1999). O 2,6-dimetoxifenol (DMP) utilizado foi o D135550-25G da Sigma. Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, foram adicionados em triplicata na seguinte ordem: 20 µL da solução estoque de 2,6 DMP a 25 mM (Anexo 4), 75 µL de tampão McIlvaine pH 5 a 50 mM (Anexo 3), 115 µL de água ultrapura estéril e 40 µL de enzima lacase ou sobrenadante do crescimento microbiano. Foi utilizado como controle positivo a enzima lacase de *Pleurotus ostreatus* e como controle negativo o sobrenadante fervido de cada isolado. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 468 nm. por 5 minutos e temperatura de 25 °C. O cálculo de atividade (Figura 11) foi feito com uma equação baseada na lei de Beer-Lambert (WOLFENDEN; WILSONS, 1982).

$$Atividade (Um/L) = diluição \times \frac{\text{saldo absorbância} \times V_{total} \times 10^3}{\epsilon \times \text{caminho óptico} \times \text{tempo}} \times \frac{1}{V_{amostra}}$$

Figura 11 - Fórmula para cálculo de atividade de lacase

A equação acima foi utilizada para os cálculos, onde:

Saldo de absorbância = abs no tempo final – abs no tempo inicial (faixa linear);

V total = 5 min (tempo final da reação);

V amostra = 250 mL;

ϵ = 49600 (coeficiente específico para a concentração de 1 mol. L⁻¹ em caminho óptico de 1 cm;

Caminho óptico = 1,101 cm;

Unidade internacional (UI) = unidade catalítica internacional que se refere à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μ Mol de substrato por minuto.

4.11 Cultivo líquido para análise de sobrenadantes no UPLC

Foram escolhidos sete isolados: 15MWL1%/s/sApicum28°C (*Massarina sp.*), 18MWL1%/s/sApicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*), 20MWL1%/s/sApicum28°C (*Aspergillus neoniger*), 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C (*Lasiodiplodia theobromae*), 7M9L1%/s/sSalina37°C (*Trichoderma harzianum*), 4CZL1%/s/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*), *1CZL1%/s/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*). Para o experimento cada inóculo foi constituído de 4 plugs de meio sólido com cultivo fúngico, cortados com ponteira p1000, em 50 mL de meio Mandels & Weber (MANDELS; WEBER, 1969) (Anexo 1), utilizando erlenmeyer de 250 mL. Esse foi preparado com 0,5% (m/v) de lignina Kraft Sigma Aldrich 471003 (SHIRAISHI *et al.*, 2021), 0,5% (m/v) de glicose e 1,125% (m/v) de extrato de levedura (SHIRAISHI *et al.*, 2021). Para cada dia de coleta dos sobrenadantes, foi colocado um controle negativo contendo apenas meio de cultura sem inóculo.

As condições de cultivo no *shaker* foram 200 rpm a 28 °C (SHIRAISHI *et al.*, 2021). As coletas de sobrenadantes ocorreram com 7, 15, 30 e 45 dias. A cada coleta, os cultivos foram colocados em tubos falcons estéreis de 50 mL e centrifugados a 13.000 × g para separação do *pellet*. Depois disso, os sobrenadantes transferidos para novos tubos, com cuidado para que o *pellet* não se misturasse, e armazenados no freezer a -20 °C.

4.11.1 Análise dos sobrenadantes fúngicos no UPLC-PDA

O experimento foi realizado em colaboração com o Dr. Alan Kelbis Oliveira Lima. Ao fim da coleta dos sobrenadantes de todos os dias estipulados, todos foram descongelados e homogeneizados. Depois foram pipetados 250 µL de cada e colocados em microtubos de 1,5 mL, em uma diluição de 1:4 com água deionizada. Em sequência, foram transferidos 800 µL para vials de vidro de 1,8 mL. A fase móvel da corrida foi composta pelos solventes A, água deionizada e 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e B, acetonitrila grau UPLC e 0,05% (v/v) de TFA. O equipamento utilizado foi UPLC-PDA Waters, modelo UPLC Acquity PDA série C15UPL180A, coluna Acquity Premier HSST3 1.8 µm VanGuard FIT 2.1 X 100 mm. Temperatura do forno da coluna: 40°C, 0,4 mL/min de vazão da fase móvel e volume de injeção: 1 µL. O tempo de corrida para cada amostra foi de 35 mins, o comprimento de onda do detector foi 210 nm (Tabela 3).

Tabela 3 - Gradiente de solventes (A: água deionizada e 0,05% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e B: acetonitrila grau UPLC e 0,05% (v/v) de TFA) *usado para análise cromatográfica em UPLC dos sobrenadantes dos cultivos fúngicos utilizando lignina kraft Sigma Aldrich 471003 em relação a bioprodutos produzidos.*

	Tempo	Vazão (mL / min)	% A	% B	Curva
1	inicial	0.400	100.0	0.0	6
2	1.00	0.400	100.0	0.0	6
3	5.00	0.400	92.0	8.0	6
4	10.00	0.400	75.0	25.0	6
5	15.00	0.400	50.0	50.0	6
6	25.00	0.400	0.0	100.0	6
7	28.00	0.400	0.0	100.0	6
8	35.00	0.400	100.0	0.0	1

4.11.2 Análise dos sobrenadantes fúngicos no UPLC-MS

O experimento foi realizado em colaboração com o Dr. Alan Kelbis Oliveira Lima e o Dr. Clenilson Martins Rodrigues. Foi utilizado para a determinação dos fitohormônios o equipamento Acquity UPLC H-Class acoplado a um espectrômetro de massa (MS) triplo quadrupolo Xevo TQD® (Waters Corp., Milford, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) e operado em modo de íons positivos e negativos.

A separação cromatográfica do analito foi realizada numa coluna Acquity Premier UPLC HSS T3 de fase reversa C18 (100 × 2,1 mm, 1,8 µm), equipada com a sua pré-coluna correspondente. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A eluição

foi realizada utilizando fase móvel composta por ácido fórmico a 0,1% em água (A) e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila (B), a uma vazão de 0,4 mL/min nas seguintes condições: gradiente linear de 5% B a 50% B em 12 minutos; em seguida, gradiente linear de 50% B a 100% de B em 3 minutos; isocrático em 100% B por 2 minutos; reequilíbrio com 5% B por 4 minutos. Um volume de injeção de 0,5 µL foi usado para os padrões e amostras. O amostrador automático UPLC foi mantido a 10 °C.

A confirmação e quantificação dos fitohormônios nas amostras analisadas foram obtidas por meio da detecção do seu íon precursor e da utilização do modo de monitorização de reações múltiplas (MRM). A transição de íons foi monitorada de acordo com as transições de massa específicas para cada composto e detalhadas na Tabela 4. Todos os parâmetros UPLC e MS foram controlados e processados utilizando o software MassLynx (versão 4.1, Waters Corp., Milford, EUA).

Tabela 4 - Parâmetros utilizados para análise dos compostos em Xevo TQD.

Modo positivo				
Composto	Íon parental (m/z)	Íon fragmento (m/z)	Tensão do cone (CV)	Energia de colisão CE (V)
Ácido trans-cinâmico	149,08	103,11	25	20
Ácido indol-3-acético	176,04	130,18	30	15
Ácido 1-metil-3-indolacético	190,13	144,18	25	18
Ácido 2-metil-3-indolacético	191,06	145,13	35	20
Ácido indol-3-butírico	204,10	130,15	30	25
Ácido 5-Metoxi-3-indolacético	206,10	160,10	30	15
Trans-zeatina	220,09	136,15	30	20
Ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolacético	220,10	174,10	30	18
Trans-zeatina ribosídeo	352,26	220,21	40	20
Modo negativo				
Composto	Íon parental (m/z)	Íon fragmento (m/z)	Tensão do cone (CV)	Energia de colisão CE (V)
Ácido salicílico	136,91	92,97	30	15
Ácido indol-2-carboxílico	160,05	116,03	30	15
Ácido abscísico	263,06	153,10	30	12
Ácido giberélico	345,28	143,24	40	25

Os parâmetros da fonte para os padrões e amostras foram: tensão do capilar a 3,00 kV, temperatura de dessolvatação a 350 °C e temperatura da fonte a 150 °C. O fluxo de gás do cone foi definido para 20 L/h e o fluxo de gás de dessolvatação para 650 L/h. O argônio foi usado como gás de colisão para a fragmentação dos padrões de fitohormônios.

5 Resultados

5.1 Coleção de microrganismos de ambiente hipersalino

A porcentagem dos sais solúveis totais na pasta de saturação (SSTsat) (%) das regiões anotada, para a Liteira Apicum foi de $9,92 \pm (1,49)$ e para a Liteira Salina foi de $9,50 \pm (1,64)$. O pH medido na Liteira Apicum foi de $7,02 \pm (0,096)$ e na Liteira Salina de $7,23 \pm (0,058)$.

Como resultado dos isolamentos, foram obtidos 88 microrganismos, dos quais 35 (Figura 12) foram classificados como fungos filamentosos por apresentarem morfologia característica, com hifas ou esporos presentes, e 51 bactérias ou fungos não filamentosos (Anexo 10).

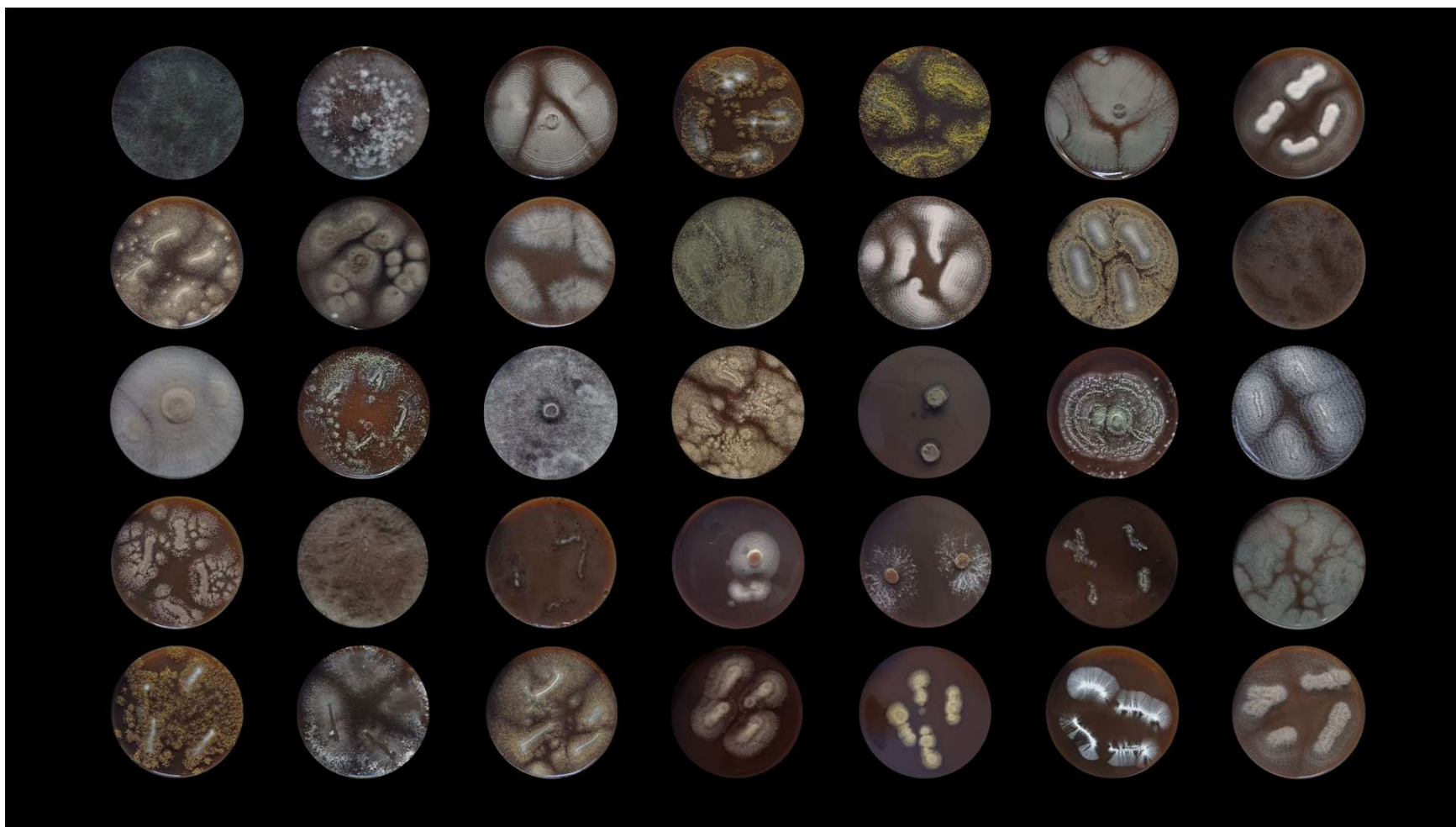


Figura 12 - Coleção de isolados fúngicos de liteiras (Apicum e Salina) de ambientes hipersalinos. Nota-se a diversidade morfológica dos fungos filamentosos obtidos.

Visualmente foi possível observar uma diversidade maior entre os isolados de fungos filamentosos do plaqueamento direto, havendo morfologias variadas, em comparação aos plaqueados posteriormente da cultura de enriquecimento. O experimento de enriquecimento resultou em apenas 2 isolados fúngicos de aspecto filamentoso, enquanto o de plaqueamento direto em 51. Durante os repiques para obtenção de isolados puros, 16 fungos não alcançaram o repique final para adição à coleção.

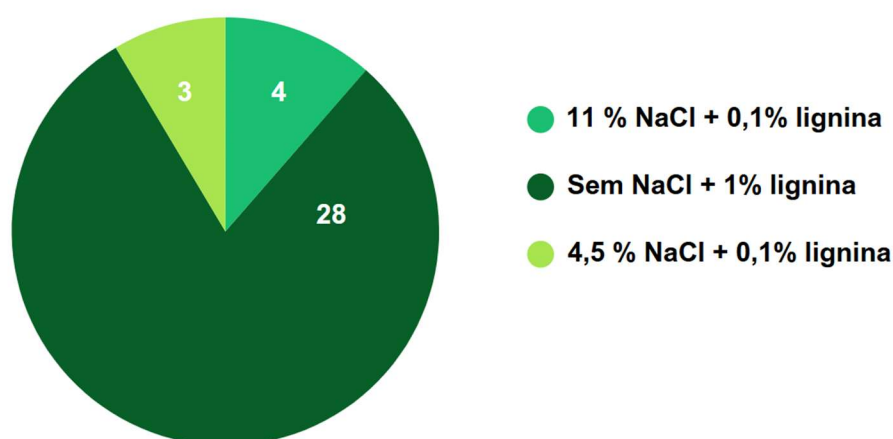


Figura 13 - Distribuição dos isolados fúngicos obtidos em meios M9, Mandel's & Weber e Czapek com lignina Kraft Sigma como fonte de carbono e com NaCl a 0, 4,5 e 11 %.

Dos 35 isolados fúngicos obtidos, 28 inicialmente cresceram em meios com 1% (m/v) de lignina Kraft e sem adição de NaCl, 3 com 0,1% (m/v) de lignina e 4,5% (m/v) de NaCl e 4 com 0,1% (m/v) de lignina e 11 % (m/v) de NaCl (Figura 13). Foram isolados mais fungos filamentosos na temperatura de 28 °C, 32 isolados, enquanto apenas 3 foram isolados a 37 °C. Em relação aos meios de cultivo utilizados, 28 fungos filamentosos foram isolados em Mandel's & Weber, 4 em M9 e 4 em CZAPEK.

5.1.1 Identificação taxonômica usando a região ITS

Foi realizada a extração de DNA de 35 isolados de fungos filamentosos. Os géis de eletroforese (Figura 14) exibem as bandas de DNA genômico. Foi realizada a amplificação da região ITS, tamanho esperado de ± 420 a 825 pb (Figura 15), de 35 isolados que foram sequenciados, porém identificação molecular foi possível para 31. Não foi possível identificar taxonomicamente os seguintes isolados fúngicos: 7MWL1%*s/s*Salina28°C, 9MWL0,1%+11%*s*Salina28°C, 12MWL1%*s/s*Apicum28°C e 10CZL0,1%+4,5%*s*Apicum28°C. Na Figura 14 é possível notar as bandas de interesse

amplificadas nos géis de eletroforese 0,8 % (m/v). Devido a variação na região ITS, o tamanho dos fragmentos amplificados esperados eram de 420 a 825 pb (MANTER; VIVANCO, 2007).

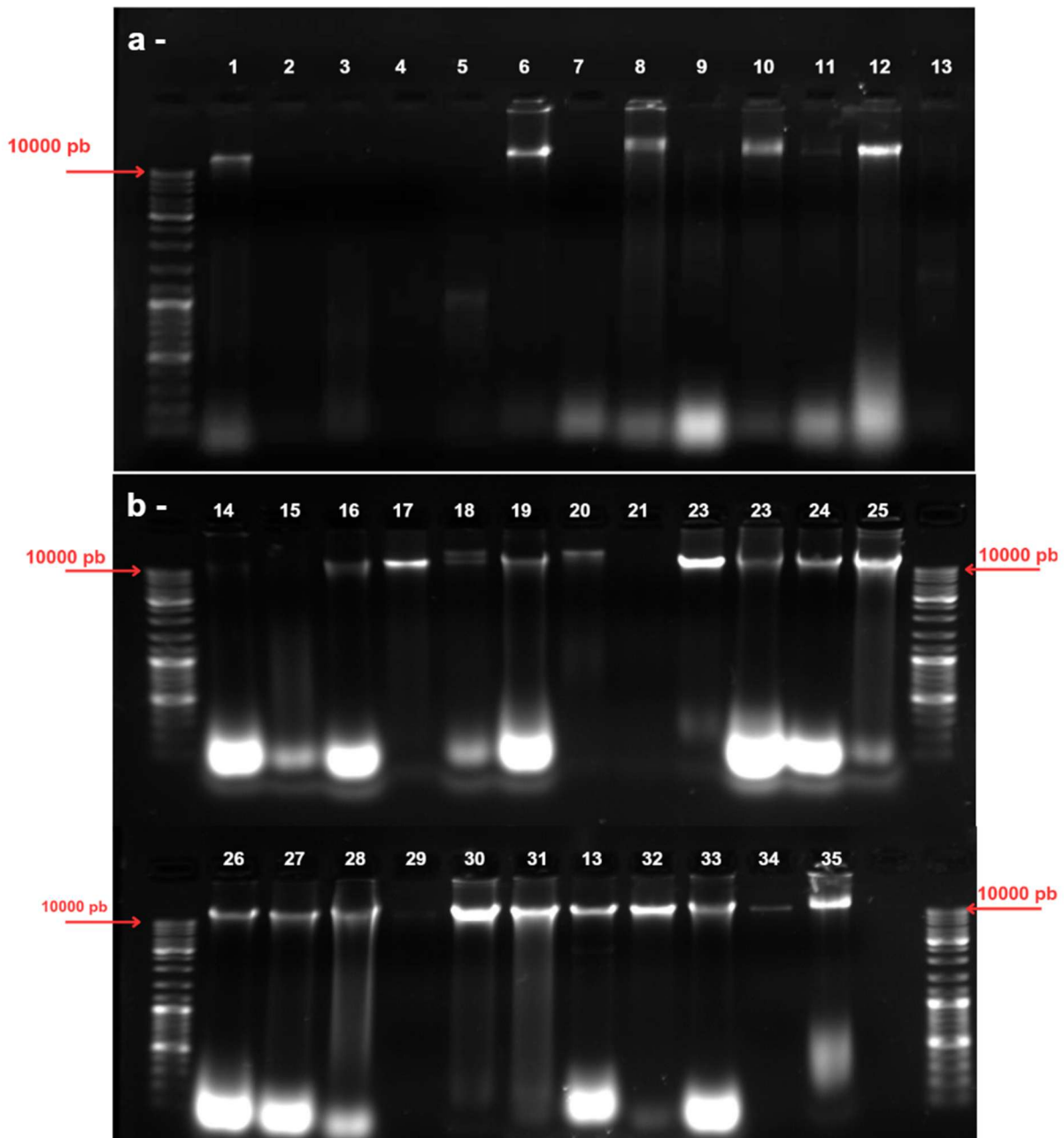


Figura 14 - DNA genômico obtido através da extração de DNA. Géis (a e b) de agarose 0,8 % (m/v) Marcador Thermo Scientific de 1 Kb. Isolados presentes nos géis: 1 = 20MWL1%/sApicum28°C, 2 = 2MWL0,1%+4,5%Apicum28°C, 3 = 6MWL1%/sSalina28°C, 4 = 11MWL1%/sApicum28°C, 5= 10MWL1%/sApicum28°C, 6 = 1MWL1%/sApicum28°C, 7 = 29MWL1%/sApicum28°C, 8 = 1M9L1%/sSalina37°C, 9 = 4CZL1%/sApicum28°C, 10 = 4M9L1%+4,5%Apicum37°C, 11 = 9MWL1%/sSalina28°C, 12 = 12MWL1%/sApicum28°C, 13 = 17MWL1%/sApicum28°C, 14 = 7MWL1%/sSalina28°C, 15 = 3MWL1%/sSalina28°C, 16 = 8MWL1%/sApicum28°C, 17 = 15MWL1%/sApicum28°C, 18 = 19MWL1%/sApicum28°C, 19 = 5MWL1%/sSalina28°C, 20 = 24MWL1%/sApicum28°C, 21= 8MWL0,1%+s11%Salina28°C, 22 = 7M9L1%/sSalina37°C, 23 = 13MWL1%/sApicum28°C, 24 = *1M9L1%/sApicum28°C, 25 = 4MWL1%/sSalina28°C, 26 = 18MWL1%/sApicum28°C, 27 = 14MWL1%/sApicum28°C, 28 = 10CZL0,1%+4,5%Apicum28°C, 29 = 6MWL0,1%+s11%Salina28°C, 30 = 7CZL1%/sApicum28°C, 31 = *1CZL1%/sApicum28°C, 32 =

9MWL0,1%+11%*s*Salina28°C, 33 = 1MWL0,1%+4,5%*s*Apicum28°C, 34 =
 2MWL0,1%+11%*s*Salina28°C e 35 = 2MWL1%*s*/sApicum28°C.

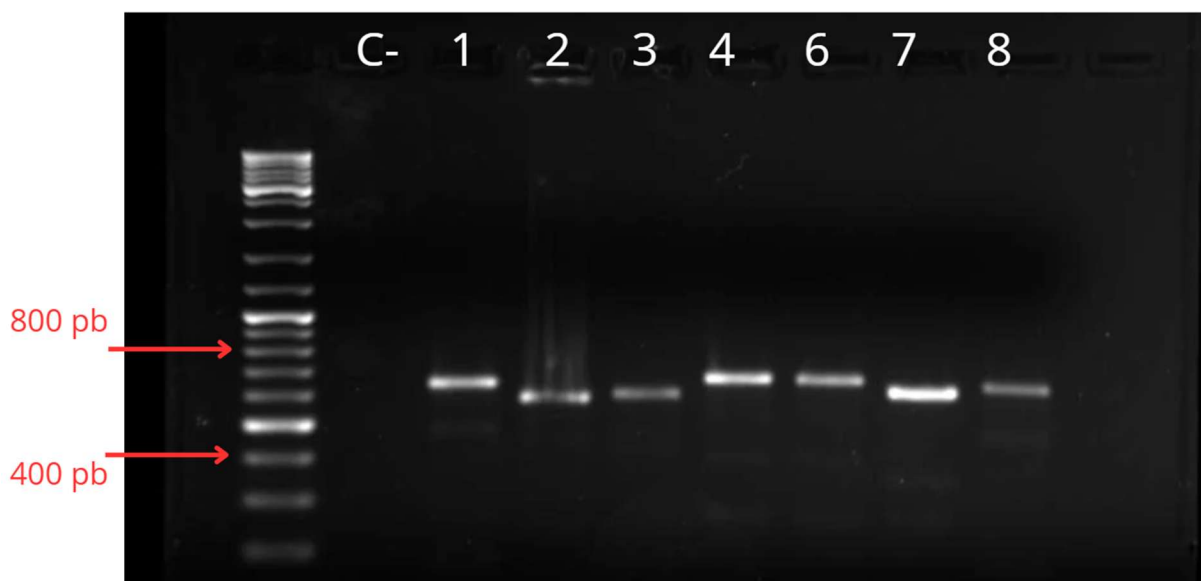


Figura 15 - Produto de PCR da amplificação da região ITS de fungos. Tamanho esperado de $\pm$ 420 a 825 pb. Gel de agarose 0,8 % (m/v). Marcador Thermo Scientific de 1 Kb. Isolados presentes no gel: 1 = 20MWL1%*s*/sApicum28°C, 2 = 2MWL0,1%+4,5%*s*Apicum28°C, 3 = 6MWL1%*s*/sSalina28°C, 4 = 11MWL1%*s*/sApicum28°C, 6 = 1MWL1%*s*/sApicum28°C, 7 = 29MWL1%*s*/sApicum28°C e 8 = 1M9L1%*s*/sSalina37°C.

Tabela 5 - Resultado da identificação taxonômica dos isolados fúngicos de ambiente salino a nível de gênero com base na região ITS.

Nome	Identificação ITS	Gênero	Filo	Unite	GenBank		pb	E value	
				Per. Ident (%)	Q Cover (%)	Per. Ident (%)			Q Cover (%)
1MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Trichoderma deliquescens</i> ou <i>crassum</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	99,69	100,00	99,53	97,00	672	0
2MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Peroneutypa</i> sp. ou <i>rubiformis</i>	<i>Peroneutypa</i>	Ascomycota			88,00	95,35	580	1E-149
3MWL1%/s/sSalina28°C	<i>Penicillium copticola</i>	<i>Penicillium</i>	Ascomycota	100,00	100,00	99,84	98,00	624	0
4MWL1%/s/sSalina28°C	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,21	99,84	99,52	98,00	634	0
5MWL1%/s/sSalina28°C	<i>Aspergillus nominae</i> ou <i>pseudonominae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	98,90	100,00	98,74	99,00	638	0
6MWL1%/s/sSalina28°C	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium</i>	Ascomycota	98,12	99,31	94,00	98,20	551	0
8MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Aspergillus</i> sp. <i>elongatus</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	99,54	100,00	97,37	97,00	480	0
9MWL1%/s/sSalina28°C	<i>Cladosporium</i> sp. ou <i>oxysporum</i>	<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	100,00	99,83	99,82	99,00	577	0
10MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Scedosporium boydii</i> <i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	<i>Scedosporium</i>	Ascomycota	100,00	100,00	99,24	97,00	625	0
11MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Trichoderma</i> sp. <i>MS-2011-F03</i> ou <i>gerdae</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	99,70	99,70	98,18	100,00	659	0

13MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Trichoderma harzianum</i> ou <i>inhamatum</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	99,23	99,54	99,37	96,00	653	0
14MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Aspergillus niger</i> ou <i>neoniger</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	98,91	100,00	99,33	98,90	639	0
15MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Massarina sp.</i> ou <i>Nigrograna norvegica</i>	<i>Massarina</i> ou <i>Nigrona</i>	Ascomycota	99,15	99,49	92,44	99,00	643	0
17MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Metarhizium anisopliae</i> ou <i>robertsii</i>	<i>Metarhizium</i>	Ascomycota	99,83	95,20	99,33	98,00	609	0
18MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Peroneutypa sp.</i> ou <i>rubiformis</i>	<i>Peroneutypa</i>	Ascomycota	99,84	80,80	95,13	85,00	672	0
19MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Aspergillus terreus</i> ou <i>hortae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,54	99,85	99,84	99,00	648	0
20MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Aspergillus awamori</i> ou <i>neoniger</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,84	99,52	99,84	98,00	631	0
24MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Metarhizium anisopliae</i> ou <i>robertsii</i>	<i>Metarhizium</i>	Ascomycota	99,16	100,00	98,66	100,00	596	0
29MWL1%/s/sApicum28°C	<i>Fusarium caeruleum</i> ou <i>buharicum</i>	<i>Fusarium</i>	Ascomycota	99,66	99,83	97,00	95,00	597	0
1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C	<i>Aspergillus sydowii</i> ou <i>amoenus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,50	95,43	98,15	98,00	608	0
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> ou <i>parva</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	Ascomycota	99,66	100,00	99,46	94,00	580	0
6MWL0,1%+s11%Salina28°C	<i>Phaeosphaeria sp.</i> ou <i>Septoriella hibernica</i>	<i>Septoriella</i>	Ascomycota	87,13	94,59	87,47	84,00	573	4E-154
8MWL0,1%+s11%Salina28°C	<i>Libertella sp.</i> ou <i>Halocryptovalsa endophytica</i>	<i>Libertella</i> ou <i>Halocryptovalsa</i>	Ascomycota	88,65	97,78	88,65	96,00	626	0

1M9L1% <i>s/s</i> Salina37°C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	100,00	100,00	100,00	99,00	626	0
4M9L1% <i>s/s</i> 4,5%Apicum37°C	<i>Aspergillus nomiae</i> ou <i>pseudonominae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,37	99,84	99,38	99,00	491	0
7M9L1% <i>s/s</i> Salina37°C	<i>Trichoderma harzianum</i> ou <i>inhamatum</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	97,56	99,70	97,16	96,00	654	0
*1M9L1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus sp. elongatus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,34	98,76	99,12	93,00	485	0
4CZL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Alfoldia vorosii</i>	<i>Alfoldia</i>	Ascomycota			87,80	100,00	584	0
7CZL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Yunnanomyces sp. ou pandanicola</i>	<i>Yunnanomyces</i>	Ascomycota	84,45	98,07	86,15	63,00	563	1e-100
*1CZL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Scedosporium boydii</i> <i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	<i>Scedosporium</i>	Ascomycota	97,25	95,82	96,69	93,00	650	0
2MWL0,1%+11% <i>s/s</i> Salina28°C	<i>Hortaea werneckii</i>	<i>Hortaea</i>	Ascomycota	100,00	93,93	100,00	93,00	511	0

***Nome de cada isolado** = número, meio de isolamento (MW = Mandel's & Weber, M9 e CZ = Czapek), porcentagem de lignina Kraft Sigma do meio de isolamento (1 % ou 0,1 % m/v), porcentagem de NaCl do meio de isolamento (*s/s* = 0 %, 4,5 % e 11 % m/v), liteira proveniente (Apicum ou Salina) e temperatura de isolamento (28 °C ou 37 °C).

Após amplificação por PCR de 35 amplicons para ITS, foram obtidas 31 sequências via sequenciamento pelo método Sanger. Os isolados que os amplicons não obtiveram sinal ou que a resolução não permitiu a construção do *contig* a partir das sequências dos primers *forward* e reverse foram: 7MWL1%*s/s*Salina28°C, 9MWL0,1%+11%*s*Salina28°C, 12MWL1%*s/s*Apicum28°C e 10CZL0,1%+4,5%*s*Apicum28°C. Os fragmentos sequenciados dos primers *forward* e reverse foram então combinados em 31 *contigs* (Anexo 6). Após comparação com os bancos de dados Unite e GenBank foram identificados pela região ITS 15 gêneros diferentes de fungos filamentosos (Tabela 5). Os resultados da identificação mostraram uma prevalência de fungos do gênero *Aspergillus* com 10 isolados, seguido pelo gênero *Trichoderma* com 4 isolados. Os outros gêneros encontrados foram: *Penicillium*, *Metarhizium*, *Fusarium*, *Alfoldia*, *Lasiodiplodia*, *Massarina*, *Pseudallescheria*, *Peroneutypa*, *Phaeosphaeria*, *Halocryptovalsa*, *Cladosporium*, *Yunnanomyces* e *Hortaea*.

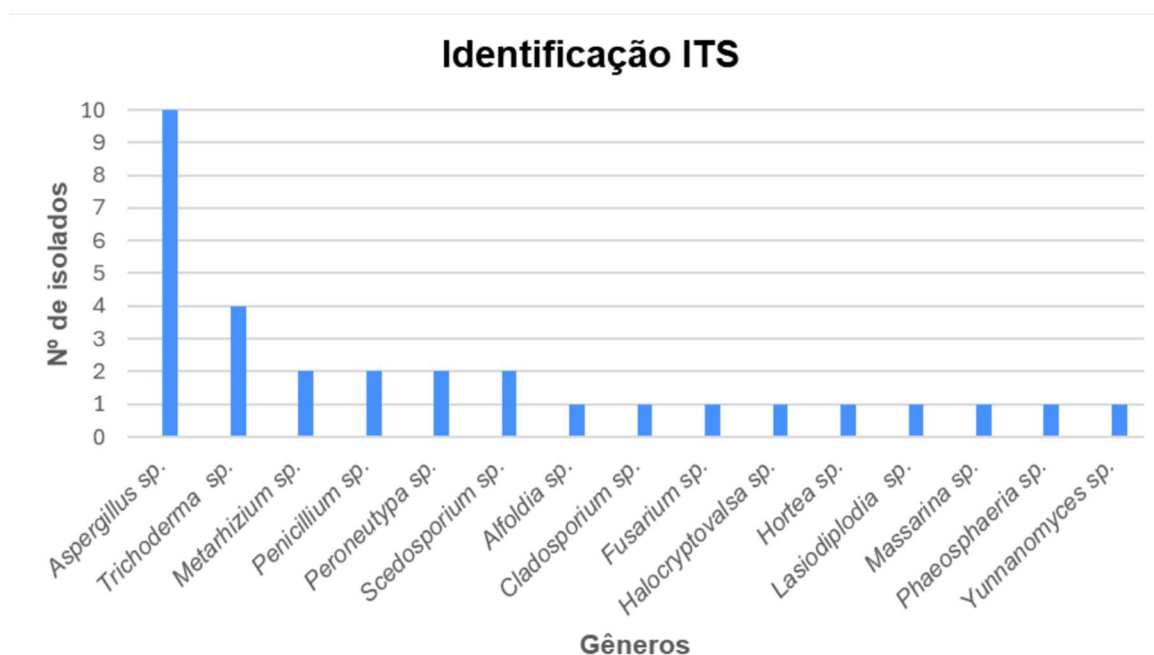


Figura 16 - Distribuição dos isolados fúngicos quanto aos gêneros pertencentes com base na identificação utilizando o marcador molecular ITS.

A figura 16 dos gêneros identificados revela a seguinte distribuição: 10 *Aspergillus*, 4 *Trichodermas*, 2 *Penicillium*, 2 *Metarhizium*, 2 *Pseudallescheria*, 2 *Peroneutypa*, 1 *Fusarium*, 1 *Alfoldia*, 1 *Lasiodiplodia*, 1 *Massarina*, 1 *Phaeosphaeria*,

1 *Halocryptovalsa*, 1 *Cladosporium*, 1 *Yunnanomyces* e 1 *Hortaea*.

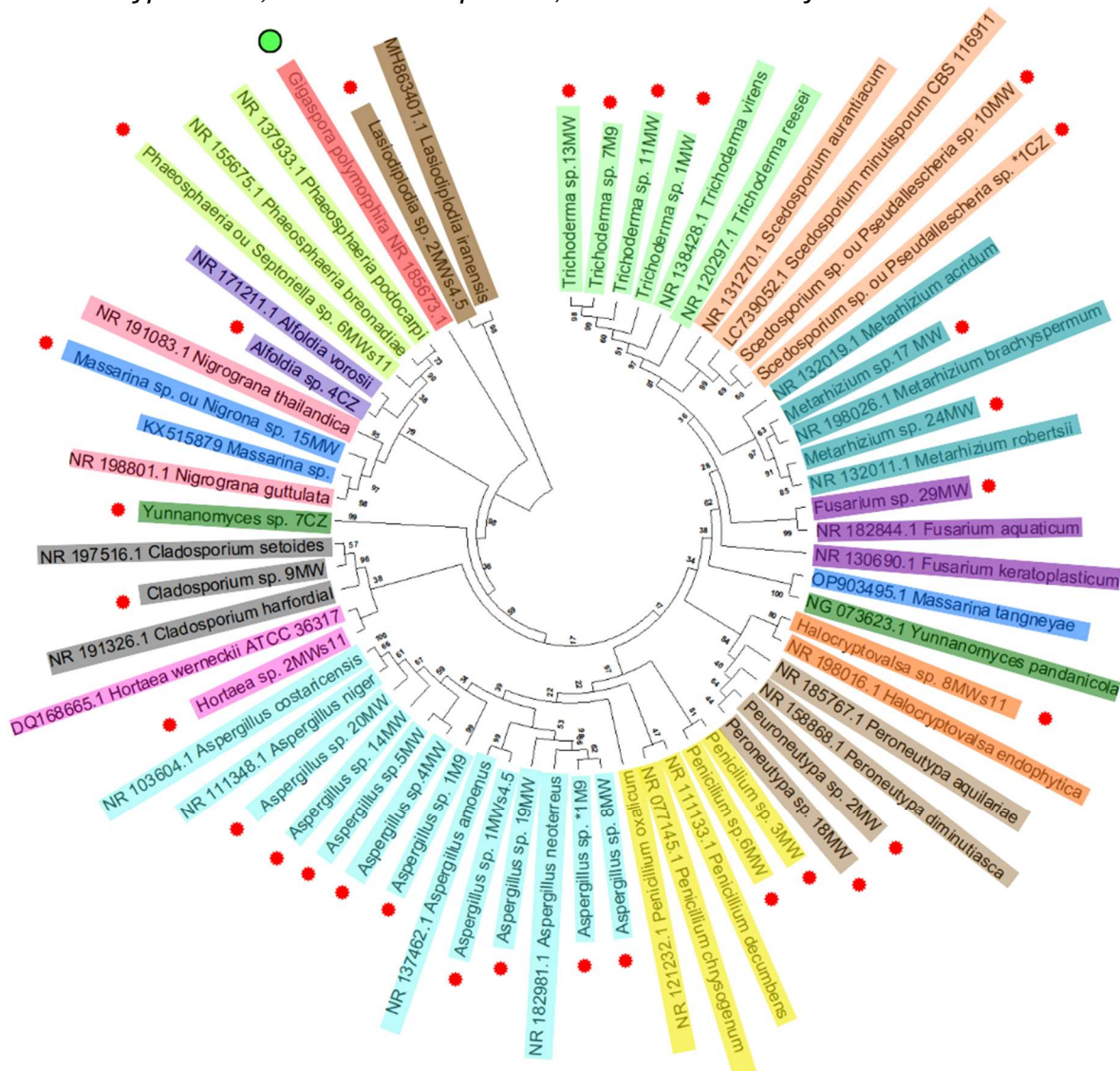


Figura 17 - Árvore filogenética dos 31 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador ITS construída pelo método Neighbour Joining gerada no Mega 11.0 após alinhamento MUSCLE de sequências de ITS. Marcação com círculo em vermelho identifica os isolados da coleção identificados e círculo verde o *outgroup* (*Gigaspora polymorpha*). Os valores nos nós representam os suportes de *bootstrap* obtidos a partir de 1.000 repetições.

A árvore filogenética (Figura 17) é composta por 9 clados principais, sendo que um se distancia mais dos como é o caso de 7CZL1%*s/s*Apicum28°C, identificado como *Yunnanomyces* sp., que ficou isolado e distante da sequência de mesmo gênero obtida no GenBank. Todos os outros isolados ficaram agrupados em seus devidos clados junto com sequências de ITS, referentes a diferentes espécies dos gêneros, obtidas no GenBank. No maior clado estão presentes o gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Os 10 isolados de *Aspergillus* fornecem uma alta variação de distâncias genética entre as sequências de mesmo gênero alinhadas.

5.1.2 Identificação taxonômica usando o marcador molecular β -tubulina

Tabela 6 - Identificação de 19 isolados fúngicos de ambiente salino e classificação de espécie com base no marcador de β -tubulina.

Nome	Identificação	Gênero	Filo	Gen Bank		Mycobank		Pb	E value
				Per. Ident (%)	Q Covery (%)	Per. Ident (%)	Q Covery (%)		
1MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Trichoderma hazianum</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	95,41	99,00			482	0
4MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus pseudonominiae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,09	99,00	99,62	94,58	553	0
5MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	<i>Aspergillus hancockii</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	90,22	99,00			541	0
6MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium</i>	Ascomycota	92,11	92,00	92,16	95,76	424	1E-163
10MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	<i>Scedosporium</i>	Ascomycota	97,79	100,00			583	0
11MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Trichoderma aggressivum</i>	<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	95,32	89,00			529	0
14MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus tritici</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	88,76	100,00			406	1E-137
17MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizum</i>	Ascomycota	97,49	99,00			442	0
19MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus terreus ou hortae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	97,25	100,00	99,43	97,00	545	0
20MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus pulverulentus ou sp.</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	98,69	98,00	99,79	91,91	519	0
1MWL0,1%+4,5% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus citrinoterreus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	90,08	96,00			533	0

2MWL0,1%+4,5% <i>s</i> Apicum28°C	<i>Diplodia corticola</i>	<i>Diplodia</i>	Ascomycota	96,05	99,00			484	0
6MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	<i>Phaeosphaeria</i>	Ascomycota	91,63	100,00			348	1E-131
9MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	<i>Zymoseptoria tritici</i>	<i>Zymoseptoria</i>	Ascomycota	99,00	90,76			481	1E-178
1M9L1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum37°C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	100,00	91,00	100,00	97,00	529	0
4M9L1% <i>s</i> 4,5% <i>s</i> Apicum37°C	<i>Aspergillus pseudonominiae</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	98,00	99,00	98,27	94,56	551	0
4CZL1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum28°C	<i>Alternaria ventricos</i>	<i>Alternaria</i>	Ascomycota	93,23	98,00			482	1E-178
7CZL1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum28°C	<i>Caliciopsis orientalis</i>	<i>Caliciopsis</i>	Ascomycota	86,90	100,00			536	7E-167
*1CZL1% <i>s</i> / <i>s</i> ApicumSalina28°C	<i>Scedosporium angustum ou boydii</i>	<i>Scedosporium</i>	Ascomycota	97,20	81,00	100,00	87,72	570	0

***Nome de cada isolado** = número, meio de isolamento (MW = Mandel's & Weber, M9 e CZ = CZAPEK), porcentagem de lignina Kraft Sigma do meio de isolamento (1 % ou 0,1 % m/v), porcentagem de NaCl do meio de isolamento (*s*/*s* = 0 %, 4,5 % e 11 % m/v), liteira proveniente (Apicum ou Salina) e temperatura de isolamento (28 °C ou 37 °C).

De toda coleção testada, foram obtidos 25 amplicons utilizando o marcador de β -tubulina (Anexo 5) que foram enviados para sequenciamento. Os isolados que os amplicons não obtiveram sinal ou que a resolução não permitiu a construção do *contig* a partir das sequências dos primers *forward* e *reverse* foram: 8MWL0,1%+11%*sSalina*28°C, 15MWL1%*s/sApicum*28°C, 7M9L1%*s/sSalina*37°C, 18MWL1%*s/sApicum*28°C, 29MWL1%*s/sApicum*28°C e 10CZL0,1%+4,5%*sApicum*28°C. Os fragmentos sequenciados dos primers *forward* e *reverse* foram então combinados em 19 *contigs* (Anexo 7). Após comparação com os bancos de dados MycoBank e GenBank foram identificadas 19 espécies. A tabela de identificação dos isolados (Tabela 6) mostra 10 gêneros encontrados, alguns em relação a identificação pela região ITS se alteraram, no caso 4CZL1%*s/sApicum*28°C (*Alternaria ventricos*), 2MWL0,1%+4,5%*sApicum*28°C (*Diplodia corticola*) e 7CZL1%*s/sApicum*28°C (*Caliciopsis orientalis*). Os gêneros encontrados foram: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Metarhizium*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Caliciopsis*, *Scedosporium*, *Phaeosphaeria* e *Zymoseptoria*. Houve 4 isolados que apresentaram E value diferente de 0 que foram: 6MWL1%*s/sSalina*28°C (*Penicillium citrinum*), 14MWL1%*s/sApicum*28°C (*Aspergillus tritici*), 6MWL0,1%+11%*sSalina*28°C (*Phaeosphaeria nodorum*), 9MWL0,1%+11%*sSalina*28°C, 4CZL1%*s/sApicum*28°C e 7CZL1%*s/sApicum*28°C. O isolado 9MWL0,1%+11%*sSalina*28°C que não foi identificado usando a região ITS se aproximou mais da sequência de *Zymoseptoria tritici* na identificação por β -tubulina.

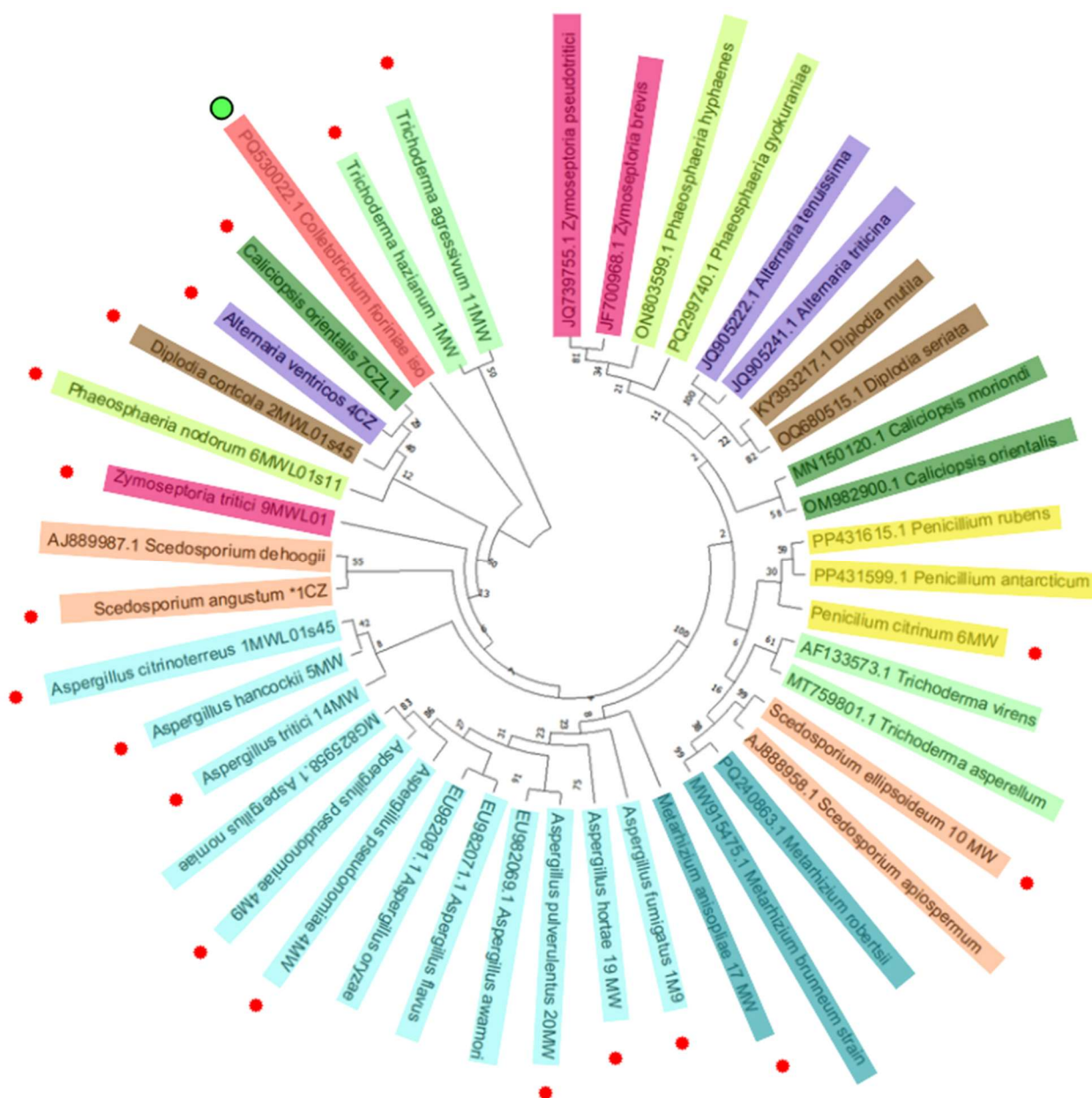


Figura 18 - Árvore filogenética dos 19 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador β -tubulina construída pelo método Neighbour Joining gerada no Mega 11.0 após alinhamento MUSCLE de sequências de β -tubulina. Marcação com círculo em vermelho identifica os isolados da coleção identificados e círculo verde o *outgroup* (*Gigaspora polymorphica*). Os valores nos nós representam os suportes de bootstrap obtidos a partir de 1.000 repetições.

Na árvore filogenética (Figura 18) construída utilizando o marcador de β -tubulina, apenas o gênero *Penicillium* ficou agrupado em um único clado, para os outros gêneros ocorreram divisões. Alguns isolados ficaram bem distantes das sequências pegadas no GenBank, como: *Caliciopsis orientalis* (7CZL1%*s*/Apicum28°C), *Zymoseptoria tritici* (9MWL0,1%+s11%Salina28°C), *Alternaria ventricos* (4CZL1%*s*/Apicum28°C), *Diplodia corticola*

(2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C)

e

Phaeosphaeria

nodorum

(6MWL0,1%+11%Salina28°C).

5.1.3 Identificação taxonômica usando o marcador molecular calmodulina

Tabela 7 - Identificação de 8 isolados fúngicos de ambiente salino e classificação de espécie com base no marcador calmodulina.

	Nome	Identificação	Gênero	Filo	Gen Bank		Mycobank		pb	E value
					Per. Ident (%)	Q Cover (%)	Per. Ident (%)	Q Cover (%)		
1	4MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus pseudonominiae</i> ou <i>pseudonominus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,66	99,00	99,65	96,75	584	0
2	5MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	<i>Aspergillus pseudonominiae</i> ou <i>pseudonominus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	98,63	100,00	99,28	95,68	579	0
3	8MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus hortae</i> ou <i>furmigatus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,47	99,00	97,70	99,30	568	0
4	14MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus neoniger</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	97,00	97,98	-	-	581	0
5	20MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus neoniger</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,00	97,58	-	-	584	0
6	1MWL0,1%+4,5% <i>s/s</i> Apicum28°C	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	99,05	99,00	99,23	95,98	423	0
7	1M9L1% <i>s/s</i> Apicum37°C	<i>Aspergillus furmigatus</i> ou <i>parafelis</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	100,00	99,14	90,44	97,07	581	0
8	4M9L1% <i>s/s</i> 4,5%Apicum37°C	<i>Aspergillus pseudonominiae</i> ou <i>pseudonominus</i>	<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	100,00	99,66	99,82	99,58	585	0

*Nome de cada isolado = número, meio de isolamento (MW = Mandel's & Weber, M9 e CZ = Czapek), porcentagem de lignina Kraft Sigma do meio de isolamento (1 % ou 0,1 % m/v), porcentagem de NaCl do meio de isolamento (*s/s* = 0 %, 4,5 % e 11 % m/v), liteira proveniente (Apicum ou Salina) e temperatura de isolamento (28 °C ou 37 °C).

Após amplificação por PCR de 14 amplicons utilizando o marcador de calmodulina (Anexo 5) de todos isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, que possuem alto grau de polimorfismo, foram obtidas 8 sequências via sequenciamento pelo método Sanger. Os isolados para os quais não foi possível obter amplicons ou que a resolução não permitiu a construção do *contig* a partir das sequências dos primers *forward* e *reverse* foram: *1M9L1%/sApicum28°C, 19MWL1%/sApicum28°C, 11MWL1%/sApicum28°C, 1MWL1%/sApicum28°C, 13MWL1%/sApicum28°C e 7M9L1%/sSalina37°C. Os fragmentos sequenciados dos primers *forward* e *reverse* foram então combinados em 8 *contigs* (Anexo 8). Após comparação com os bancos de dados MicoBank e GenBank foram identificados quanto a espécie pelo marcador molecular de calmodulina (Tabela 7) 8 isolados de *Aspergillus*. Houve uma prevalência da espécie *A. pseudonominiae* ou *pseudonominus*, com 3 isolados, em relação a nomenclatura da espécie ambas são correspondentes. Não foi possível a identificação de espécie correspondente para os isolados 14MWL1%/sApicum28°C e 20MWL1%/sApicum28°C pelo MycoBank, pois as sequências de mais similaridade estavam com identificações restritas.

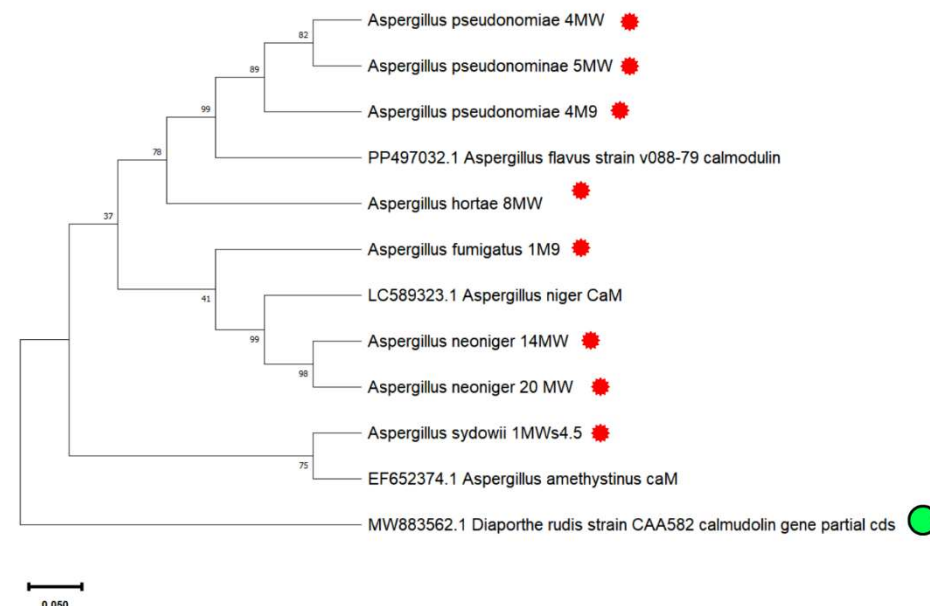


Figura 19 - Árvore filogenética dos 8 isolados fúngicos de ambiente salino baseada na sequência do marcador calmodulina construída pelo método Neighbour Joining gerada no Mega 11.0 após alinhamento MUSCLE de sequências de calmodulina. Marcação com círculo em vermelho identifica os isolados da coleção identificados e círculo verde o *outgroup* (*Diaporthe rudis*). A escala de distância da árvore (0,050) representa o número de diferenças de nucleotídeos entre as sequências de DNA. Os valores nos nós representam os suportes de bootstrap obtidos a partir de 1.000 repetições.

A árvore filogenética (Figura 19) mostra proximidade genética entre os isolados de *A. pseudonimiae*, os identificados com *A. neoniger* também ficaram próximos. O mais distante foi o isolado identificado como *A. sydowii* (1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C).

5.2 Crescimento em ligninas industriais

Nome	BRM	Identificação	Kraft da Sigma 1%			Kraft industrial 1%			Organosolv 1%		
			7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
1MWL1%/sApicum28°C	71764	<i>Trichoderma deliquescens</i>									
2MWL1%/sApicum28°C	71765	<i>Peroneutypa rubiformis</i>									
3MWL1%/sSalina28°C	71766	<i>Penicillium copticola</i>									
4MWL1%/sSalina28°C	71767	<i>Aspergillus pseudononiae</i>									
5MWL1%/sSalina28°C	71768	<i>Aspergillus pseudononiae</i>									
6MWL1%/sSalina28°C	71769	<i>Penicillium citrinum</i>									
7MWL1%/sSalina28°C	71770	Não identificado									
8MWL1%/sApicum28°C	71771	<i>Aspergillus hortae</i>									
9MWL1%/sSalina28°C	71772	<i>Cladosporium oxysporum</i>									
10MWL1%/sApicum28°C	71773	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>									
11MWL1%/sApicum28°C	71774	<i>Trichoderma sp.</i>									
12MWL1%/sApicum28°C	71775	Não identificado									
13MWL1%/sApicum28°C	71776	<i>Trichoderma harzianum</i>									
14MWL1%/sApicum28°C	71777	<i>Aspergillus neoniger</i>									
15MWL1%/sApicum28°C	71778	<i>Massarina sp.</i>									
17MWL1%/sApicum28°C	71798	<i>Metarhizium robertsii</i>									
18MWL1%/sApicum28°C	71799	<i>Peroneutypa rubiformis</i>									
19MWL1%/sApicum28°C	71800	<i>Aspergillus hortae</i>									
20MWL1%/sApicum28°C	71801	<i>Aspergillus neoniger</i>									
24MWL1%/sApicum28°C	71802	<i>Metarhizium robertsii</i>									
29MWL1%/sApicum28°C	71803	<i>Fusarium caeruleum</i>									
1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C	71963	<i>Aspergillus sydowii</i>									
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	71971	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>									
2MWL0,1%+11%Salina28°C	71972	<i>Hortaea werneckii</i>									
6MWL0,1%+s11%Salina28°C	72088	<i>Phaeosphaeria sp.</i>									
8MWL0,1%+s11%Salina28°C	71976	<i>Halocryptovalsa sp.</i>									
9MWL0,1%+11%Salina28°C	71975	<i>Zymoseptoria tritici</i>									
4M9L1%+s4,5%Apicum37°C	71977	<i>Aspergillus fumigatus</i>									
7M9L1%/sSalina37°C	71978	<i>Aspergillus pseudononiae</i>									
1M9L1%/sSalina37°C	71979	<i>Trichoderma harzianum</i>									
*1M9L1%/sApicum28°C	71980	<i>Aspergillus elongatus</i>									
4CZL1%/sApicum28°C	71981	<i>Alfoldia vorosii</i>									
7CZL1%/sApicum28°C	71982	<i>Yunnanomyces sp.</i>									
10CZL0,1%+4,5%Apicum28°C	71983	Não identificado									
*1CZL1%/sApicum28°C	71984	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>									



Figura 20 - *Heatmap* do crescimento de 35 diferentes isolados fúngicos provenientes de ambiente hipersalino em meio Mandel's & Weber contendo 1 % (m/v) de três diferentes ligninas (kraft da Sigma, kraft industrial e organosolv industrial) e na ausência de NaCl a 28 °C. Aos diferentes níveis de crescimento foram atribuídas notas de 0 (sem crescimento: cor branca) a 5 (crescimento máximo: cor vinho), de acordo com a área da placa ocupada pelos fungos testados aos 7, 15 e 30 dias.

O *heatmap* (Figura 20) mostra que a maior parte dos isolados fúngicos testados possuem aptidão para crescer em ligninas industriais na concentração de 1% (m/v) sem adição de sal. O crescimento dos isolados foi mais acelerado em ligninas industriais em comparação a lignina com alto grau de pureza (Sigma). Interessantemente, alguns isolados fúngicos testados apresentaram aspecto mais robusto nas ligninas industriais que na lignina da Sigma, como 9MWL1%/s/salina28°C (*Cladosporium oxysporum*), *1M9L1%/s/sApicum28°C (*Aspergillus elongatus*) e 29MWL1%/s/sApicum28°C (*Fusarium caeruleum*). Os isolados que mais se destacaram, crescendo mais robustamente desde os 7 dias em todos os tipos de lignina foram 1MWL1%/s/sApicum28°C (*Trichoderma deliquescens*) e 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C (*Lasiodiplodia theobromae*). Dois isolados provenientes do isolamento com 11% de NaCl não cresceram em nenhuma das ligninas, a saber, 2MWL0,1%+11%salina28°C (*Hortaea werneckii*) e 8MWL0,1%+s11%salina28°C (*Halocryptovalsa* sp.). O isolado 6MWL0,1%+s11%salina28°C (*Phaeosphaeria* sp.) somente cresceu na lignina Kraft industrial.

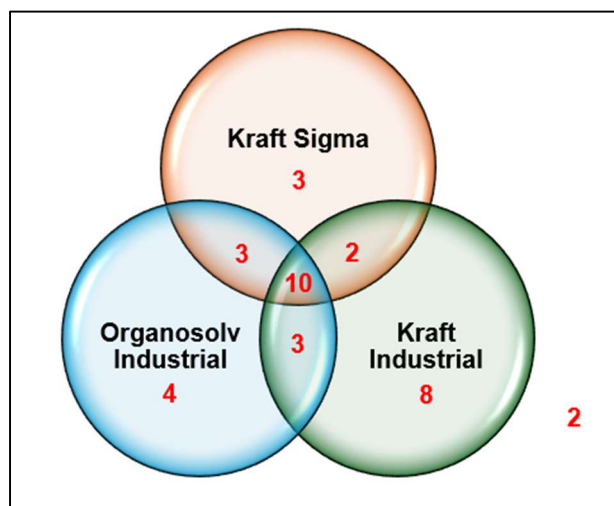


Figura 21 - Diagrama de Venn – Crescimento de 35 isolados fúngicos diferentes em ligninas industriais na ausência de NaCl, demonstrando a distribuição de crescimento nas 3 ligninas, considerando o melhor crescimento de cada isolado em 30 dias. Cultivo em meios sólido Mandel's & Weber contendo 1 % (m/v) de três diferentes ligninas (kraft da Sigma, kraft industrial e organosolv industrial) a 28 °C.

O diagrama de Venn (Figura 21) mostrou que 10 isolados cresceram de forma robusta em todas as ligninas (1MWL1%/s/sApicum28°C, 2MWL1%/s/sApicum28°C, 5MWL1%/s/sSalina28°C, 13MWL1%/s/sApicum28°C, 15MWL1%/s/sApicum28°C, 18MWL1%/s/sApicum28°C, 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C, 4M9L1%+s4,5%Apicum37°C, 11MWL1%/s/sApicum28°C e *1CZL1%/s/sApicum28°C), 3 em ambas ligninas industriais (19MWL1%/s/sApicum28°C, 29MWL1%/s/sApicum28°C e *1M9L1%/s/sApicum28°C), 8 exclusivamente na lignina Kraft industrial (3MWL1%/s/sSalina28°C, 6MWL1%/s/sSalina28°C, 7MWL1%/s/sSalina28°C, 8MWL1%/s/sApicum28°C, 17MWL1%/s/sApicum28°C, 24MWL1%/s/sApicum28°C, 4CZL1%/s/sApicum28°C e 6MWL0,1%+s11%Salina28°C), 4 na organosolv industrial (9MWL1%/s/sSalina28°C, 12MWL1%/s/sApicum28°C, 7M9L1%/s/sSalina37°C e 7CZL1%/s/sApicum28°C), 3 exclusivamente na lignina Kraft da Sigma (20MWL1%/s/sApicum28°C, 1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C e 9MWL0,1%+11%Salina28°C), 3 nas ligninas Sigma e organosolv industrial (4MWL1%/s/sSalina28°C, 10MWL1%/s/sApicum28°C e 10CZL0,1%+4,5%Apicum28°C), 2 na lignina Kraft Sigma e lignina Kraft industrial (14MWL1%/s/sApicum28°C e 1M9L1%/s/sSalina37°C) e 2 isolados não foram capazes de crescer em nenhuma lignina testada (2MWL0,1%+11%Salina28°C e 8MWL0,1%+s11%Salina28°C)

Nome	BRM	Identificação	Kraft da Sigma 0,2%			Kraft industrial 0,2%			Organosolv 0,2%		
			7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
1MWL1%/sApicum28°C	71764	<i>Trichoderma deliquescens</i>									
2MWL1%/sApicum28°C	71765	<i>Peroneutypa rubiformis</i>									
3MWL1%/sSalina28°C	71766	<i>Penicillium copticola</i>									
4MWL1%/sSalina28°C	71767	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>									
5MWL1%/sSalina28°C	71768	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>									
6MWL1%/sSalina28°C	71769	<i>Penicillium citrinum</i>									
7MWL1%/sSalina28°C	71770	Não identificado									
8MWL1%/sApicum28°C	71771	<i>Aspergillus hortae</i>									
9MWL1%Salina28°C	71772	<i>Cladosporium oxysporum</i>									
10MWL1%/sApicum28°C	71773	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>									
11MWL1%/sApicum28°C	71774	<i>Trichoderma sp.</i>									
12MWL1%/sApicum28°C	71775	Não identificado									
13MWL1%/sApicum28°C	71776	<i>Trichoderma harzianum</i>									
14MWL1%/sApicum28°C	71777	<i>Aspergillus neoniger</i>									
15MWL1%/sApicum28°C	71778	<i>Massarina sp.</i>									
17MWL1%/sApicum28°C	71798	<i>Metarhizium robertsii</i>									
18MWL1%/sApicum28°C	71799	<i>Peroneutypa rubiformis</i>									
19MWL1%/sApicum28°C	71800	<i>Aspergillus hortae</i>									
20MWL1%/sApicum28°C	71801	<i>Aspergillus neoniger</i>									
24MWL1%/sApicum28°C	71802	<i>Metarhizium robertsii</i>									
29MWL1%/sApicum28°C	71803	<i>Fusarium caeruleum</i>									
1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C	71963	<i>Aspergillus sydowii</i>									
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	71971	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>									
6MWL0,1%+s11%Salina28°C	72088	<i>Phaeosphaeria sp.</i>									
9MWL0,1%+s11%Salina28°C	71985	<i>Zymoseptoria tritici</i>									
8MWL0,1%+s11%Salina28°C	71976	<i>Halocryptovalsa sp.</i>									
2MWL0,1%+s11%Salina28°C	71975	<i>Hortaea werneckii</i>									
1M9L1%/sSalina37°C	71977	<i>Aspergillus fumigatus</i>									
4M9L1%+s4,5%Apicum37°C	71978	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>									
7M9L1%/sSalina37°C	71979	<i>Trichoderma harzianum</i>									
*1M9L1%/sApicum28°C	71980	<i>Aspergillus elongatus</i>									
4CZL1%/sApicum28°C	71981	<i>Alfoldia vorosii</i>									
7CZL1%/sApicum28°C	71982	<i>Yunnanomyces sp.</i>									
10CZL0,1%+4,5%Apicum28°C	71983	Não identificado									
*1CZL1%/sApicum28°C	71984	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>									



Figura 22 - *Heatmap* do crescimento de 35 diferentes isolados fúngicos provenientes de ambiente hipersalino em meio Mandel's & Weber contendo 0,2 % (m/v) de três diferentes ligninas (kraft da Sigma, kraft industrial e organosolv industrial) e na presença de 2 % (m/v) de NaCl a 28 °C. Aos diferentes níveis de crescimento foram atribuídas notas de 0 (sem crescimento: cor branca) a 5 (crescimento máximo: cor vinho), de acordo com a área da placa ocupada pelos fungos testados aos 7, 15 e 30 dias.

O heatmap do crescimento em placa (Figura 22) de todos isolados fúngicos, nos períodos de 7, 15 e 30 dias, utilizando meio Mandel's & Weber contendo as ligninas Kraft da Sigma e as ligninas industriais, a 0,2% (m/v), e adição de 2% (m/v) de NaCl, expõem crescimento para quase todos isolados, exceto para 9MWL0,1%+s11%Salina28°C (*Zymoseptoria tritici*), que não cresceu em lignina organosolv. Os isolados que mais se destacaram crescendo em todas as ligninas com crescimento máximo em 30 dias foram: 1MWL1%*s/s*Apicum28°C (*T. deliquescens*), 2MWL1%*s/s*Apicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*), 7MWL1%*s/s*Salina28°C (não identificado), 11MWL1%*s/s*Apicum28°C (*Trichoderma sp.*), 13MWL1%*s/s*Apicum28°C (*T. harzianum*) e 18MWL1%*s/s*Apicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*).

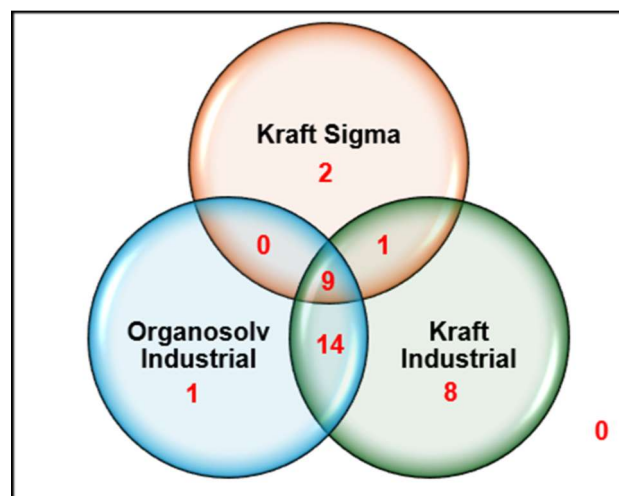


Figura 23 - Diagrama de Venn - Crescimento de 35 isolados fúngicos diferentes em ligninas industriais na presença de 2% (m/v) NaCl demonstrando a distribuição de crescimento nas 3 ligninas, considerando o melhor crescimento de cada isolado em 30 dias. Cultivo em meios sólido Mandel's & Weber contendo 0,2 % (m/v) de três diferentes ligninas (kraft da Sigma, kraft industrial e organosolv industrial) a 28 °C.

O diagrama de Venn (Figura 23) mostrou que 9 isolados cresceram de forma robusta em todas as ligninas (1MWL1%*s/s*Apicum28°C, 2MWL1%*s/s*Apicum28°C, 6MWL1%*s/s*Salina28°C, 7MWL1%*s/s*Salina28°C, 9MWL1%*s/s*Salina28°C, 11MWL1%*s/s*Apicum28°C, 13MWL1%*s/s*Apicum28°C, 4CZL1%*s/s*Apicum28°C e 18MWL1%*s/s*Apicum28°C), 14 nas ligninas industriais (4MWL1%*s/s*Salina28°C, 5MWL1%*s/s*Salina28°C, 8MWL1%*s/s*Apicum28°C, 10MWL1%*s/s*Apicum28°C,

24MWL1%*s/s*Apicum28°C, 29MWL1%*s/s*Apicum28°C,
 2MWL0,1%+*s*4,5%Apicum28°C, 17MWL1%*s/s*Apicum28°C,
 2MWL0,1%+11%*s*Salina28°C, 1M9L1%*s/s*Salina37°C, 4M9L1%*s*4,5%Apicum37°C,
 *1M9L1%*s/s*Apicum28°C, 7CZL1%*s/s*Apicum28°C e *1CZL1%*s/s*Apicum28°C), 8 na
 Kraft industrial (3MWL1%*s/s*Salina28°C, 12MWL1%*s/s*Apicum28°C,
 14MWL1%*s/s*Apicum28°C, 15MWL1%*s/s*Apicum28°C, 20MWL1%*s/s*Apicum28°C,
 19MWL1%*s/s*Apicum28°C, 6MWL0,1%+*s*11%Salina28°C e
 9MWL0,1%+11%*s*Salina28°C), 1 na organosolv (8MWL0,1%+*s*11%Salina28°C), 2 na
 Kraft da Sigma (7M9L1%*s/s*Salina37°C e 10CZL0,1%+4,5%*s*Apicum28°C) e 1 na
 Kraft Sigma e Kraft industrial (1MWL0,1%+4,5%*s*Salina28°C).

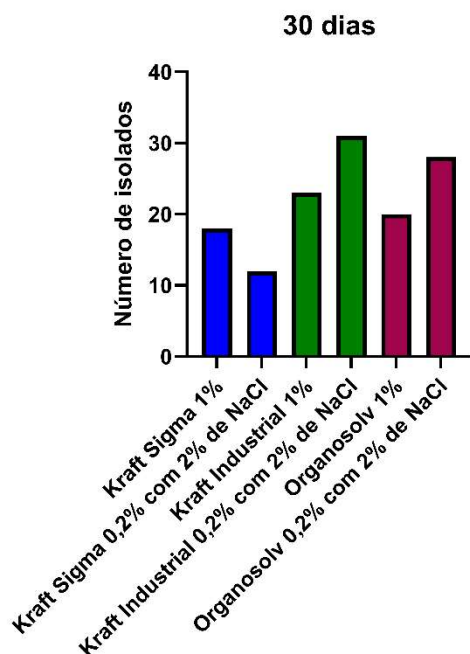


Figura 24 - Número de isolados considerando o melhor crescimento de cada em 30 dias. Cultivo em meios sólido Mandel's & weber utilizando como fonte de carbono 3 tipos de ligninas (kraft da Sigma, kraft industrial e organosolv industrial), na presença ou ausência de 2% (m/v) NaCl a 28 °C. Barras em azul representando a lignina kraft Sigma, em verde a lignina kraft industrial e em rosa escuro organosolv industrial.

A maior parte dos fungos atingiu o melhor crescimento em lignina Kraft industrial (Figura 24). Em ambas as condições de cultivo o crescimento em ligninas industriais se mostrou melhor que na lignina da Sigma Aldrich 471003. Com a adição de NaCl o melhor crescimento de isolados na lignina Kraft industrial foi mais que o dobro da Sigma, o mesmo ocorreu comparando a organosolv com a lignina da Sigma. A adição de NaCl e redução de lignina levou a um crescimento melhor dos isolados utilizando ligninas industriais.

5.3 Crescimento em compostos fenólicos

Nome	BRM	Identificação	Ácido vanílico						Ácido 4 hidroxibenzóico						Catecol					
			Sem NaCl			Com NaCl 2 %			Sem NaCl			Com NaCl 2 %			Sem NaCl			Com NaCl 2 %		
			7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias	7 dias	15 dias	30 dias
1MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71764	<i>Trichoderma deliquescens</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
2MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71765	<i>Peroneutypa rubiformis</i>	3	5	5	0	0	0	4	5	5	3	5	5	2	5	5	0	3	5
3MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71766	<i>Penicillium copticola</i>	3	4	5	3	4	5	2	4	5	2	5	5	0	0	0	0	0	0
4MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71767	<i>Aspergillus pseudonimiae</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	1	4	5
5MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71768	<i>Aspergillus pseudonimiae</i>	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	3	5	5	0	3	5
6MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71769	<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71770	Não identificado	1	2	2	0	0	1	2	3	4	2	3	4	0	0	0	0	0	0
8MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71771	<i>Aspergillus hortae</i>	2	4	5	2	4	5	2	4	4	3	5	5	0	0	0	0	0	0
9MWL1% <i>s</i> /sSalina28°C	71772	<i>Cladosporium oxysporum</i>	2	5	5	2	3	4	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
10MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71773	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	2	5	5	2	2	2	2	4	5	1	3	5	0	0	0	0	0	0
11MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71774	<i>Trichoderma sp.</i>	4	5	5	4	3	5	5	5	5	5	5	5	0	0	5	0	0	0
12MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71775	Não identificado	1	1	3	1	2	3	2	4	5	2	4	5	0	0	0	0	0	0
13MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71776	<i>Trichoderma harzianum</i>	4	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
14MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71777	<i>Aspergillus neoniger</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5	1	5	5
15MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71778	<i>Massarina sp.</i>	1	1	3	0	0	0	1	2	5	1	2	4	0	0	0	0	0	0
17MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71798	<i>Metarhizium robertsii</i>	1	2	3	1	1	2	2	3	4	2	2	3	0	0	0	0	0	0
18MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71799	<i>Peroneutypa rubiformis</i>	0	0	0	0	1	1	1	3	5	3	5	5	0	0	0	0	0	0
19MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71800	<i>Aspergillus hortae</i>	4	5	5	4	5	5	5	5	5	4	5	5	0	3	5	0	0	0
20MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71801	<i>Aspergillus neoniger</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	1	5	5
24MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71802	<i>Metarhizium robertsii</i>	1	2	3	1	1	2	2	3	4	2	2	3	0	0	0	0	0	0
29MWL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71803	<i>Fusarium caeruleum</i>	2	3	5	0	0	0	3	5	5	3	5	5	0	0	0	0	0	0
1MWL0,1%+4,5% <i>s</i> Salina28°C	71963	<i>Aspergillus sydowii</i>	4	5	5	3	5	5	4	5	5	4	5	5	1	3	3	0	0	1
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	71971	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	5	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0
2MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	71972	<i>Hortaea werneckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6MWL0,1%+s11% <i>s</i> Salina28°C	72088	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0
8MWL0,1%+s11% <i>s</i> Salina28°C	71976	<i>Halocryptovalsa sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	71975	<i>Zymoseptoria tritici</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0
1M9L1% <i>s</i> /sSalina37°C	71977	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	4	4	2	4	4	5	5	5	5	5	5	0	0	3	0	0	0
4M9L1%+s4,5%Apicum37°C	71978	<i>Aspergillus pseudonimiae</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	0	0	0
7M9L1% <i>s</i> /sSalina28°C	71979	<i>Trichoderma harzianum</i>	0	0	3	0	4	4	0	2	3	0	2	2	0	0	0	0	0	0
*1M9L1% <i>s</i> /sApicum28°C	71980	<i>Aspergillus elongatus</i>	2	3	3	1	2	5	2	3	3	3	4	5	1	3	4	0	0	0
4CZL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71981	<i>Alfoldia vorosii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7CZL1% <i>s</i> /sApicum28°C	71982	<i>Yunnanomyces sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10CZL0,1%+4,5% <i>s</i> Apicum28°C	71983	Não identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*1CZL1% <i>s</i> /sApicumSalina28°C	71984	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	2	4	5	0	1	1	2	3	5	1	2	4	0	0	0	0	0	0

Figura 25 - *Heatmap* do crescimento dos isolados fúngicos de ambiente salino em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos avaliados foram ácido vanílico, ácido 4 hidroxibenzóico e catecol, com ou sem suplementação de de 2% (m/v) de NaCl. Avaliação do crescimento foi feita com atribuição de notas de 0 (sem crescimento) a 5 (crescimento máximo) nos dias 7, 15 e 30 em placas contendo meio de cultura Mandel's & Weber incubadas a 28 °C.

O *heatmap* (Figura 25) mostra uma maior quantidade de isolados crescendo de forma robusta no meio de cultura contendo os ácidos vanílico e 4 hidroxibenzóico, sendo que em 7 dias a maior parte destes já tinham crescimento com atribuições de notas 4 e 5. Em catecol, a maior parte dos isolados não foi capaz de crescer no período de 30 dias, principalmente na condição com adição de NaCl. A maior parte dos isolados crescidos em compostos fenólicos pertenciam aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. Os isolados que mais se destacaram crescendo em todos os meios foram: os de *A. neoniger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C e 14MWL1%*s/s*Apicum28°C) e um *A. pseudonomiae* (4MWL1%*s/s*Salina28°C).

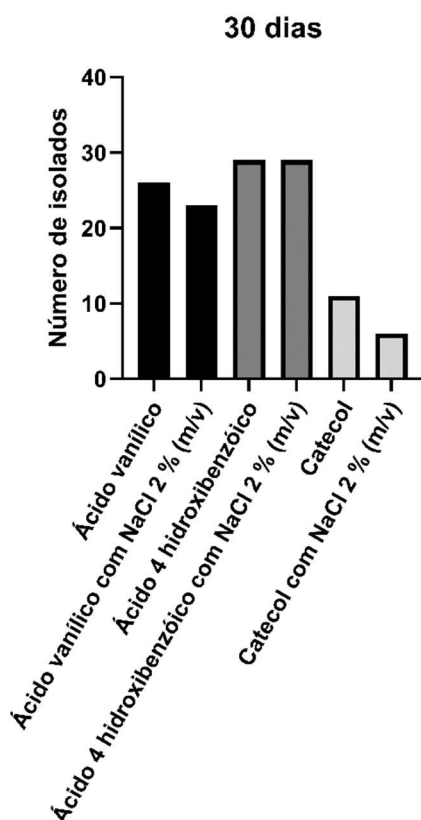


Figura 26 - Número de isolados que cresceram no meio sólido Mandel's & Weber a 28 °C suplementado com 20 mM (m/v) de compostos fenólicos (ácido vanílico, ácido 4 hidroxibenzóico e catecol), na presença ou ausência de 2% (m/v) de NaCl no período de 30 dias. Barras em preto representado o ácido vanílico, em cinza o ácido 4 hidroxibenzóico e em cinza claro o catecol.

A figura 26 mostra um menor número de isolados fúngicos que conseguiram crescer aos 30 dias quando o meio de cultivo Madel's & Weber teve adição de 2 % de NaCl (m/v), além da presença dos compostos fenólicos ácido vanílico e catecol. Já

para o meio suplementado com ácido 4 hidroxidobenzóico, houve um número igual de isolados fúngicos que cresceram aos 30 dias na presença e ausência de NaCl no meio de cultivo. Importante notar também que o ácido 4 hidroxidobenzóico foi o composto que favoreceu um maior número de isolados a crescerem, 29. O composto onde houve o segundo maior número de isolados que cresceram em compostos fenólicos foi ácido vanílico, 26 isolados; este número caindo para 23 com a adição de NaCl. Nas placas contendo catecol apenas 11 isolados cresceram aos 30 dias e com adição de NaCl este número de isolados se reduziu para 6.

5.4 Atividade enzimática de lacase utilizando 2,6-DMP

Dos 35 isolados de fungos de ambiente salino testados, a maior parte dos cultivos visualmente produziram uma quantidade significativa de biomassa. Entretanto a atividade de lacase, calculada após a subtração do valor de absorbância dos controles negativos (sobrenadantes fervidos) de cada isolado, foi detectada apenas para 5 isolados: *1CZL1%/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*), 4CZL1%/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*), 8MWL0,1%+s11%Salina28°C (*Halocryptovalsa sp.*), 15MWL1%/sApicum28°C (*Massarina sp.*), 18MWL1%/sApicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*). Destes, apenas dois apresentaram uma absorbância mais expressiva, *1CZL1%/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*) e 4CZL1%/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*). Nos outros foi possível ver leves alterações de coloração nas placas de testes em relação aos controles negativos (sobrenadantes fervidos). E quando realizado os cálculos, os valores de absorbância foram bem baixos, refletindo em atividades enzimáticas quase inexistentes (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade lacase de extratos brutos de fungos de ambiente salino usando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como substrato em 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

	10 dias (UI/mL)	Desv. Padrão	15 dias (UI/mL)	Desv. Padrão	20 dias (UI/mL)	Desv. Padrão	25 dias (UI/mL)	Desv. Padrão	30 dias (UI/mL)	Desv. Padrão
*1CZL1%/sApicum28°C	0,0114779	0,0003820	0,0156362	0,0001165	0,0178616	0,0007259	0,0119484	0,0002077	0,0109515	0,0006142
4CZL1%/sApicum28°C	0,0341668	0,0005993	0,0535035	0,0024946	0,0544801	0,0005627	0,0702410	0,0010647	0,0826905	0,0020709
8MWL0,1%+s11%Salina28°C	0,0029172	6,489E-05	0,0087286	0,0003136	0,0073018	0,0001492	0,0054808	0,0000920	0,0056487	0,0002191
15MWL1%/sApicum28°C	0,0003154	4,641E-05	0,0023068	0,0001112	0,0051909	0,0001857	0,0058979	0,0003537	0,0056970	0,0003406
18MWL1%/sApicum28°C	0,0091839	0,0006562	0,0016074	0,0002524	0,0005087	0,0002747	0,0015082	0,0011523	0,0003840	0,0000578
Controle	0,0436472	0,0032692	0,0885218	0,0017642	0,0469723	0,0016271	0,0402593	0,0008921	0,0376231	0,0010597

***Controle diluído em 20 vezes.** Controle (*Pleurotus ostreatus*), *1CZL1%/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*), 4CZL1%/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*), 8MWL0,1%+s11%Salina28°C (*Halocryptovalsa sp.*), 15MWL1%/sApicum28°C (*Massarina sp.*), 18MWL1%/sApicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*).

Dos 5 isolados que apresentaram atividade lacase (Tabela 8), o isolado 4CZL1%/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*) foi o melhor resultado, 0,08269 UI/ mL em

30 dias de cultivo. Os outros isolados que também apresentaram atividade lacase foram: *1CZL1%/s/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*) com 0,1786 UI/ mL em 20 dias, 18MWL1%/s/sApicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*) com 0,0091839 UI/ mL em 10 dias, 15MWL1%/s/sApicum28°C com 0,005879 ul/ mL em 25 dias e 8MWL0,1%+s11%Salina28°C (*Halocryptovalsa sp.*) com 0,008729 UI/ mL em 15 dias. A atividade do controle positivo (enzima lacase de *Pleurotus ostreatus*), levando em consideração a diluição em 20 vezes, foi superior à de todos isolados, com média de 0,051405 UI/ mL ou 1,028095 (valor multiplicado por 20) UI/ mL.

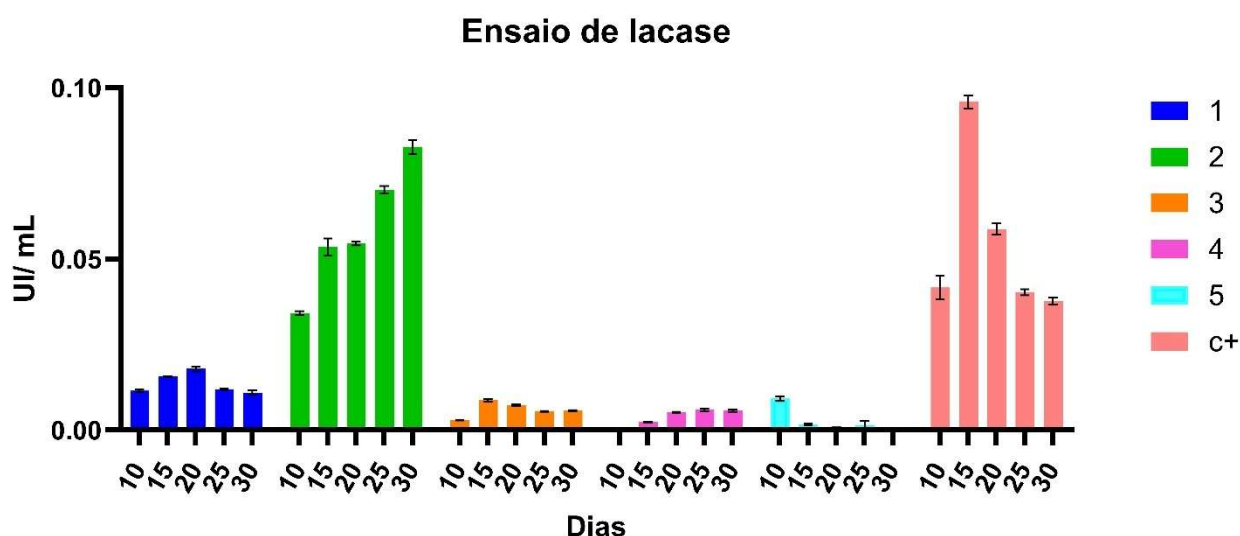


Figura 27 – Gráfico da atividade lacase de extratos brutos de fungos de ambiente salino usando 2,6-dimetoxifenol (DMP) como substrato em 10, 15, 20, 25 e 30 dias. ***Controle diluído em 20 vezes. C+ = controle (*Pleurotus ostreatus*), 1 = *1CZL1%/s/sApicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*), 2 = 4CZL1%/s/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*), 3 = 8MWL0,1%+s11%Salina28°C (*Halocryptovalsa sp.*), 4 = 15MWL1%/s/sApicum28°C (*Massarina sp.*), 5 = 18MWL1%/s/sApicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*).**

A Figura 27 evidencia que o isolado 4CZL1%/s/sApicum28°C (*Alfoldia vorosii*), o qual apresentou maior atividade, estava aumentando a atividade enzimática ao decorrer de 30 dias. A produção de lacase pelos isolados foi bem abaixo do controle positivo (lacase de *Pleurotus ostreatus*) que foi diluído em 20 vezes para os testes. Os outros isolados se portaram de forma diversa em relação ao período de melhor atividade.

5.5 Análise cromatogramas

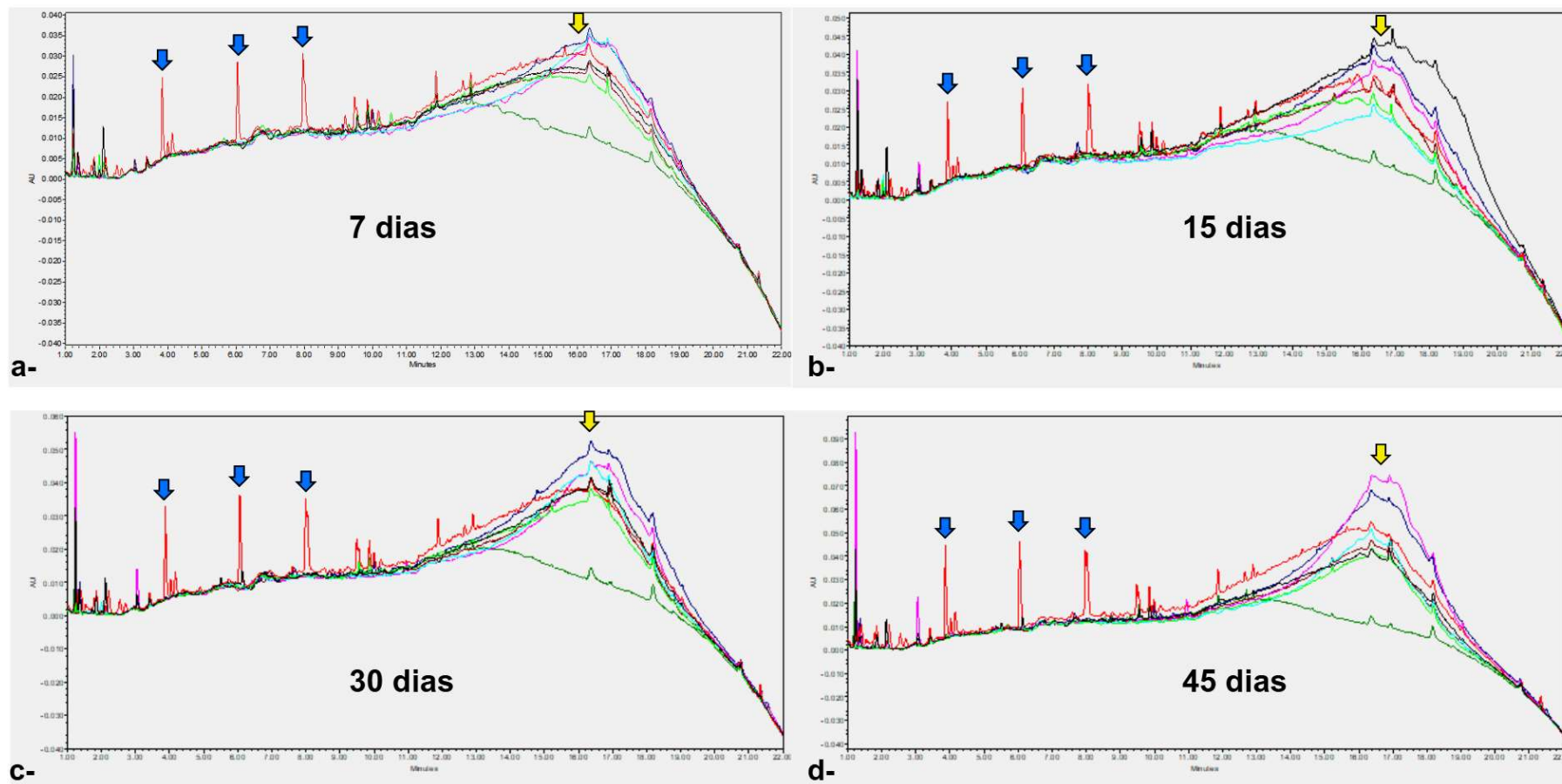


Figura 28 - Cromatograma de UPLC a 210 nm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%*s/s*Apicum28°C), *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%*Apicum*28°C), *Alfoldia vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C), *Trichoderma harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C), *Massarina sp.* (15MWL1%*s/s*Apicum28°C), *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%*s/s*Apicum28°C), *Aspergillus neoniger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C) e controle

negativo. Isolados cultivados em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias. Setas azuis indicando compostos presentes no meio e seta amarela indicando pico dos oligômeros de lignina.

Os perfis cromatográficos (Figura 28) dos sobrenadantes fúngicos — cultivados em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — permitem a comparação entre diferentes tempos de crescimento e gêneros dos isolados. Observa-se que alguns apresentaram redução significativa dos oligômeros de lignina, indicados pela seta amarela, como no caso de *Aspergillus neoniger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C). Em todos, o controle contendo apenas meio de cultura com lignina Kraft apresentava picos, indicados pelas setas azuis, não presentes nos isolados. Isso pode ser devido aos isolados fúngicos estarem utilizando a lignina e compostos do meio no seu metabolismo. Alguns picos não presentes no controle negativo também foram encontrados no isolados de *S. ellipsoideum* (*1CZL1%*s/s*Apicum28°C), *L. theobromae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C), *A. vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C) e *T. harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C).

5.5.1 *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/s/sApicum28°C)

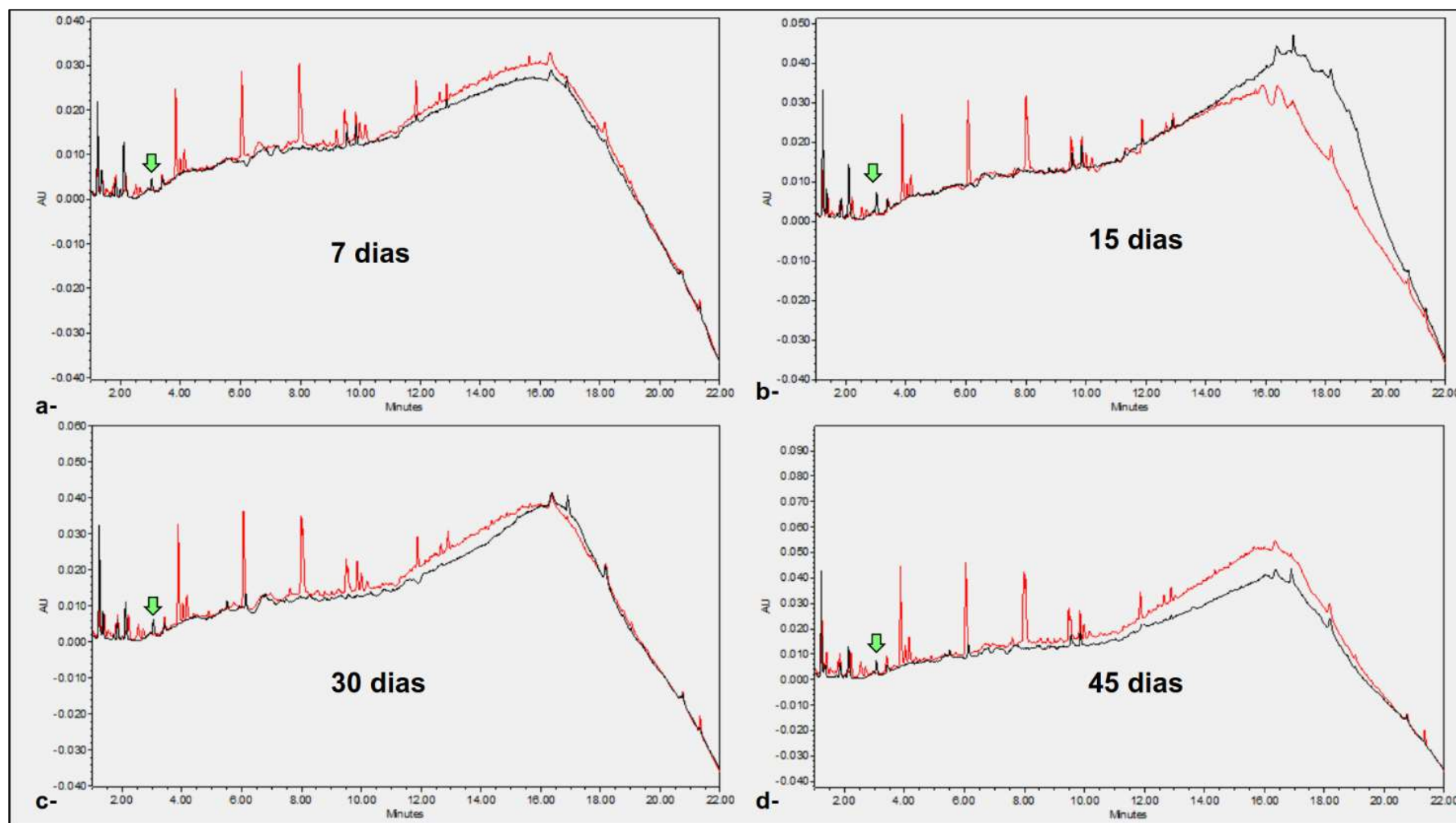


Figura 29 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC-PDA a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%**s/sApicum28°C**, **cromatograma preto**) e controle negativo (**cromatograma vermelho**). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias. Seta em verde indicando pico presente no isolado, mas não no controle.

Tabela 9 - Características do tempo de retenção e área dos picos presentes no cromatograma de UPLC-PDA do sobrenadante de *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%**s/sApicum28°C**) crescido por 7, 15, 30 e 45 dias em meio Mandel's & Weber contendo lignina kraft a 28 °C a 200 rpm.

	Tempo de retenção	Área (µV*sec)
Pico 7 dias	2,106	116149
Pico 15 dias	2,091	98444
Pico 30 dias	2,121	38196
Pico 45 dias	2,130	93038

O cromatograma (Figura 29), obtido por UPLC-PDA dos sobrenadantes de *Scedosporium ellipsoideum* (1CZL1%**s/sApicum28°C**) — cultivado em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — revela um pico (seta verde), presente em todos os dias avaliados e ausente no controle negativo. O tempo de retenção observado ($\approx 2,1$ min; Tabela 9) sugere tratar-se de um composto de natureza polar. A área foi maior em 7 dias, ou seja, a concentração foi diminuindo, porém em 45 dias aumentou novamente. Em relação aos oligômeros de lignina ao longo do período é perceptível alterações em relação ao controle. Na análise de 15 dias, o pico do isolado fúngico foi bem superior quando comparado ao controle. Isso pode ser uma consequência de alterações de estrutura que resultaram na maior emissão ou solubilização da parte insolúvel de lignina presente no meio e em 45 dias o pico ficou abaixo do controle, indicando possível consumo.

5.5.2 *Lasiodiplodia theobromae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C)

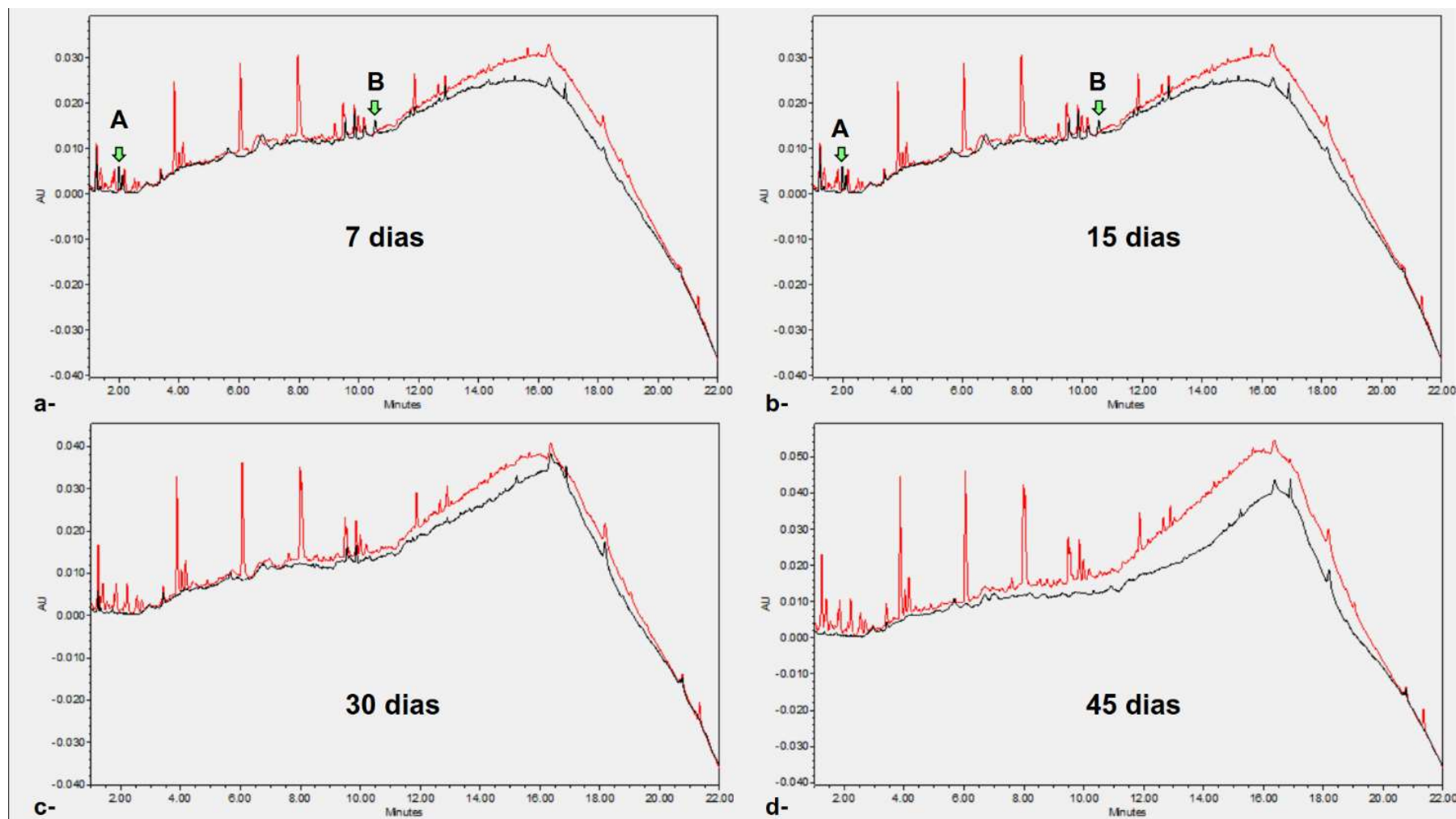


Figura 30 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC-PDA a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Lasiodiplodia theobromae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C, cromatograma preto) e controle negativo (cromatograma vermelho) a- Crescimento de 7 dias; b- Crescimento de 15 dias; c- Crescimento de 30 dias; d- Crescimento de 45 dias. Seta em verde indicando pico presente no isolado, mas não no controle.

Tabela 10 - Características do tempo de retenção e área dos picos presentes no cromatograma de UPLC-PDA do sobrenadante de *Lasiodiplodia theobromae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C) crescido por 7, 15, 30 e 45 dias em meio Mandel's & Weber contendo lignina kraft a 28 °C a 200 rpm.

	Tempo de retenção	Área (µV*sec)
Pico A 7 dias	1,989	19115
Pico A 15 dias	1,985	15616
Pico A 30 dias	--	--
Pico A 45 dias	--	--
Pico B 7 dias	10,533	56500
Pico B 15 dias	10,546	15682
Pico B 30 dias	--	--
Pico B 45 dias	--	--

O cromatograma (Figura 30), obtido por UPLC-PDA dos sobrenadantes de cultura de *Lasiodiplodia theobromae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C) — cultivada em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — revela dois picos adicionais, denominados A e B (setas verdes), observados no isolado e ausentes no controle. Ambos somente estão presentes até a avaliação de 15 dias, o que pode indicar produção de composto para utilização no próprio metabolismo. O pico A é um composto polar com tempo de retenção de $\pm 1,99$ min (Tabela 10), enquanto o pico B possivelmente mais apolar com tempo $\pm 10,5$ min. A área para ambos foi maior em 7 dias e depois de 15 dias diminuiu de forma a não ser mais visível em 30 dias. Em relação aos oligômeros de lignina, ao longo do período estes se mantiveram próximo aos do controle negativo, entretanto, em 45 dias diminuíram de forma mais significativa.

5.5.3 *Alfoldia vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C)

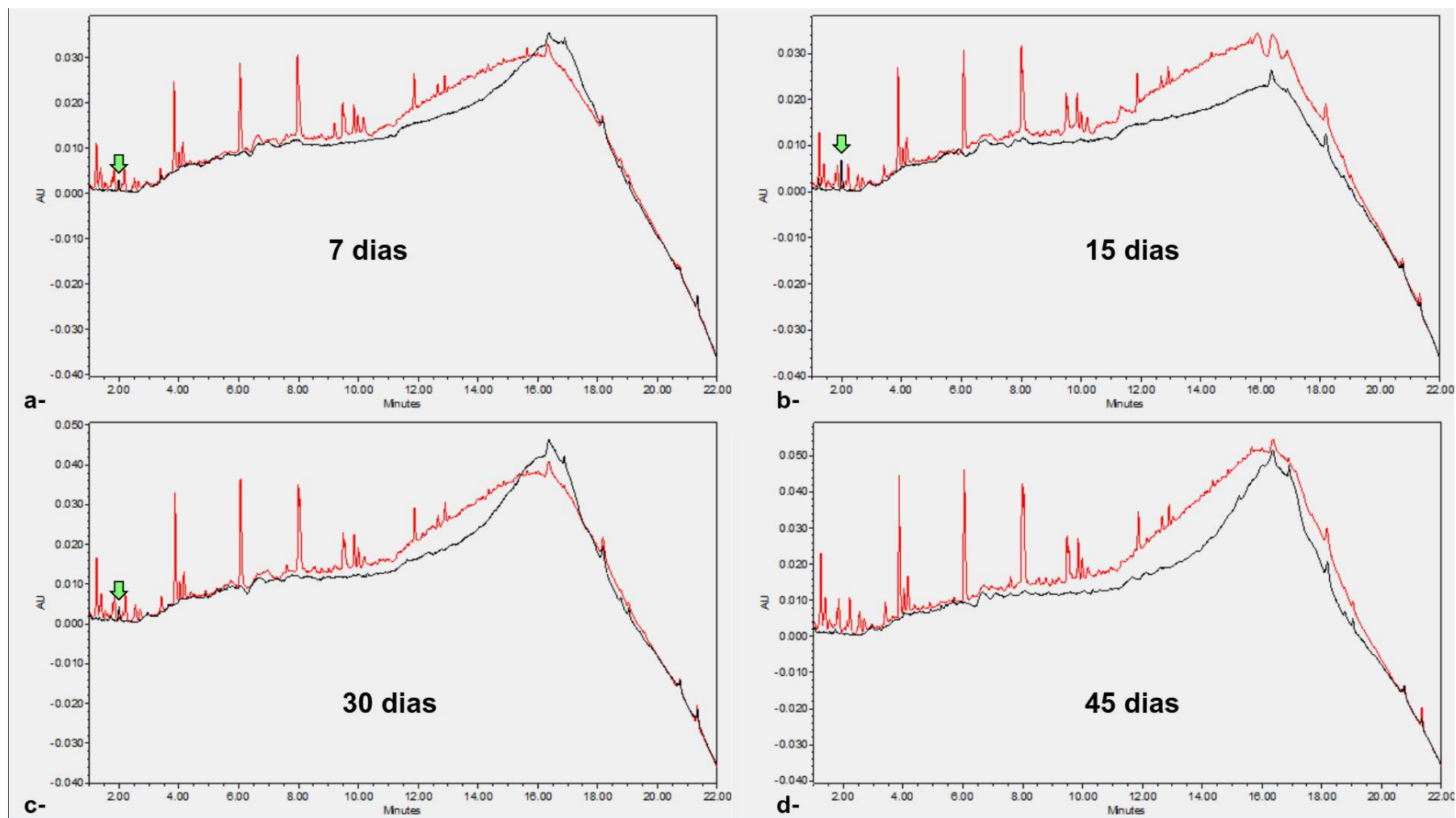


Figura 31 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Alfoldia vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C, cromatograma preto) e controle negativo (cromatograma vermelho). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias. Seta em verde indicando pico presente no isolado, mas não no controle.

Tabela 11- Características do tempo de retenção e área dos picos presentes no cromatograma de UPLC-PDA do sobrenadante de *Alfoldia vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C) crescido por 7, 15, 30 e 45 dias em meio Mandel's & Weber contendo lignina kraft a 28 °C a 200 rpm.

	Tempo de retenção	Área (µV*sec)
Pico 7 dias	1,983	45688
Pico 15 dias	1,986	21713
Pico 30 dias	1,994	49835
Pico 45 dias	--	--

O cromatograma (Figura 31) da análise de UPLC-PDA dos sobrenadantes de *Alfoldia vorosii* (4CZL1%*s/s*Apicum28°C) — cultivado em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — indica um pico representado pela seta verde presente até a avaliação de 30 dias que não está no controle negativo, com tempo de retenção ± 1,98 min (Tabela 11), o que significa que é um composto polar. A área foi maior em 30 dias e depois diminuiu até não ser possível notar em 45 dias, então possivelmente o composto foi utilizado no metabolismo. Os oligômeros de lignina do isolado ao longo do período foram sofrendo modificações em relação ao controle, sendo que em 7, 15 e 45 dias ficaram abaixo e só na avaliação de 30 o cromatograma ficou acima do controle negativo.

5.5.4 *Trichoderma harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C)

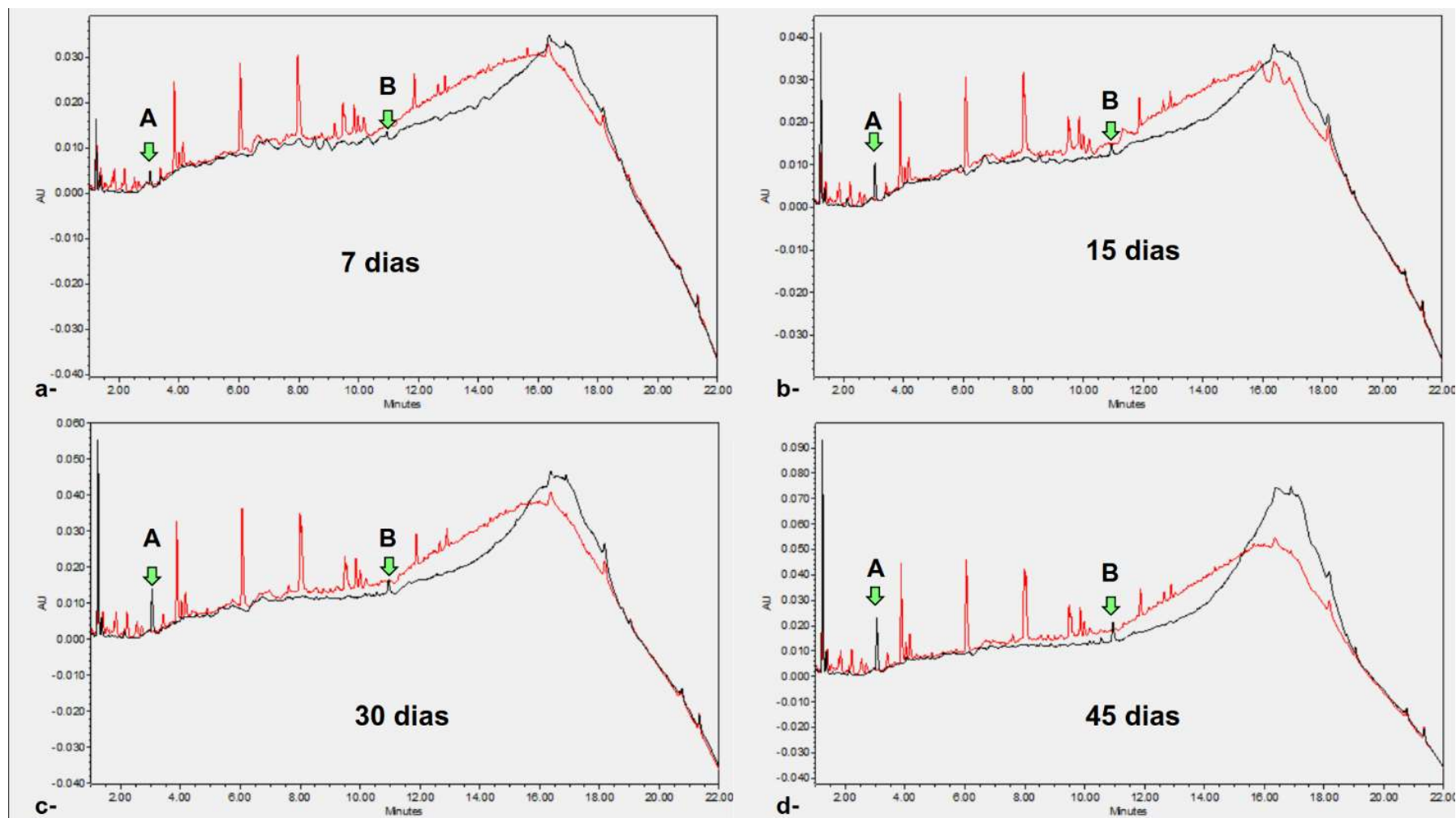


Figura 32 – Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC a 210 nm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de

glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Análise dos sobrenadantes de *Trichoderma harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C, cromatograma preto) e controle negativo (cromatograma vermelho). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias. Setas em verde indicando pico presentes no isolado, mas não no controle.

Tabela 12 - Características do tempo de retenção e área dos picos presentes no cromatograma de UPLC-PDA do sobrenadante de *Trichoderma harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C) crescido por 7, 15, 30 e 45 dias em meio Mandel's & Weber contendo lignina kraft a 28 °C a 200 rpm.

	Tempo de retenção	Área (µV*sec)
Pico A 7 dias	3,030	42958
Pico A 15 dias	3,035	6667
Pico A 30 dias	3,046	48588
Pico A 45 dias	3,052	84199
Pico B 7 dias	10,938	651417
Pico B 15 dias	10,942	912372
Pico B 30 dias	10,951	55394
Pico B 45 dias	10,943	321479

O cromatograma (Figura 32) obtido por UPLC-PDA dos sobrenadantes de cultura de *Trichoderma harzianum* (amostra 7M9L1%*s/s*Salina37°C) — cultivado em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — revela dois picos, denominados A e B (setas verdes), presentes no isolado e ausentes no controle. Ambos estão presentes até a avaliação de 45 dias, o que pode indicar produção de composto não utilizado no metabolismo. O pico A é um composto polar com tempo de retenção de $\pm 3,04$ min (Tabela 12), enquanto o pico B possivelmente mais apolar com tempo $\pm 10,94$ min. A área do pico A foi maior em 45 dias e do pico B em 15 dias, depois diminuiu e subiu novamente em 45 dias. Os oligômeros de lignina apresentaram pico maior que os do controle negativo em 45 dias, indicando modificações que possivelmente geraram sinal maior ou solubilização da parte insolúvel de lignina presente no meio.

5.5.5 *Massarina* sp. (15MWL1%*s/s*Apicum28°C)

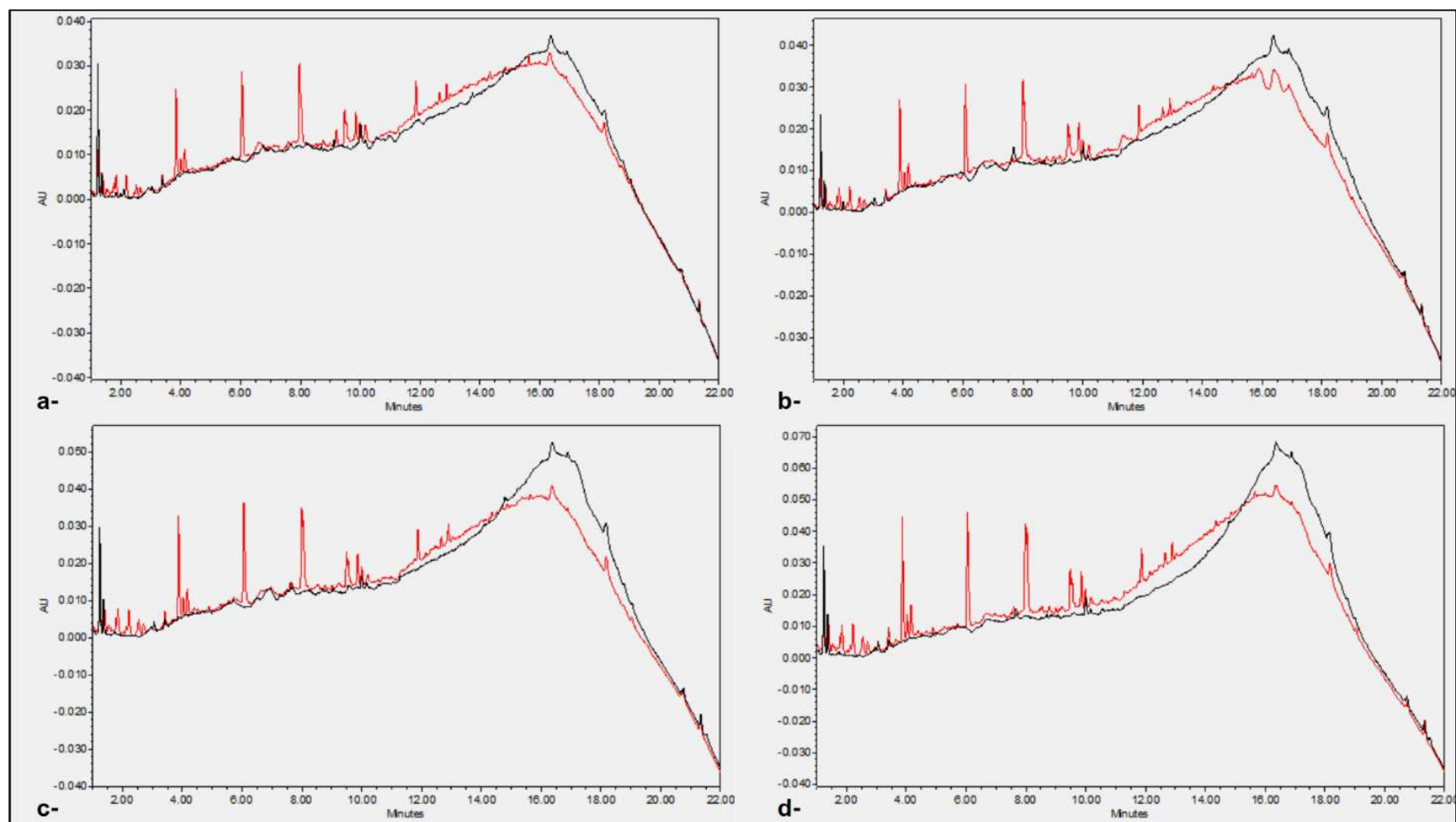


Figura 33 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC-PDA a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Massarina sp.* (**15MWL1%*s*/sApicum28°C, cromatograma preto**) e controle negativo (**cromatograma vermelho**). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias.

No cromatograma (Figura 33) da análise de UPLC-PDA dos sobrenadantes de *Massarina sp.* (15MWL1%*s*/sApicum28°C) não foi possível notar picos presentes no isolado que se diferenciasssem do controle. Em 45 dias, o pico dos oligômeros de lignina foi maior em relação ao controle, indicando modificações que possivelmente geraram sinal maior ou solubilização da parte insolúvel de lignina presente no meio.

5.5.6 *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%*s/s*Apicum28°C)

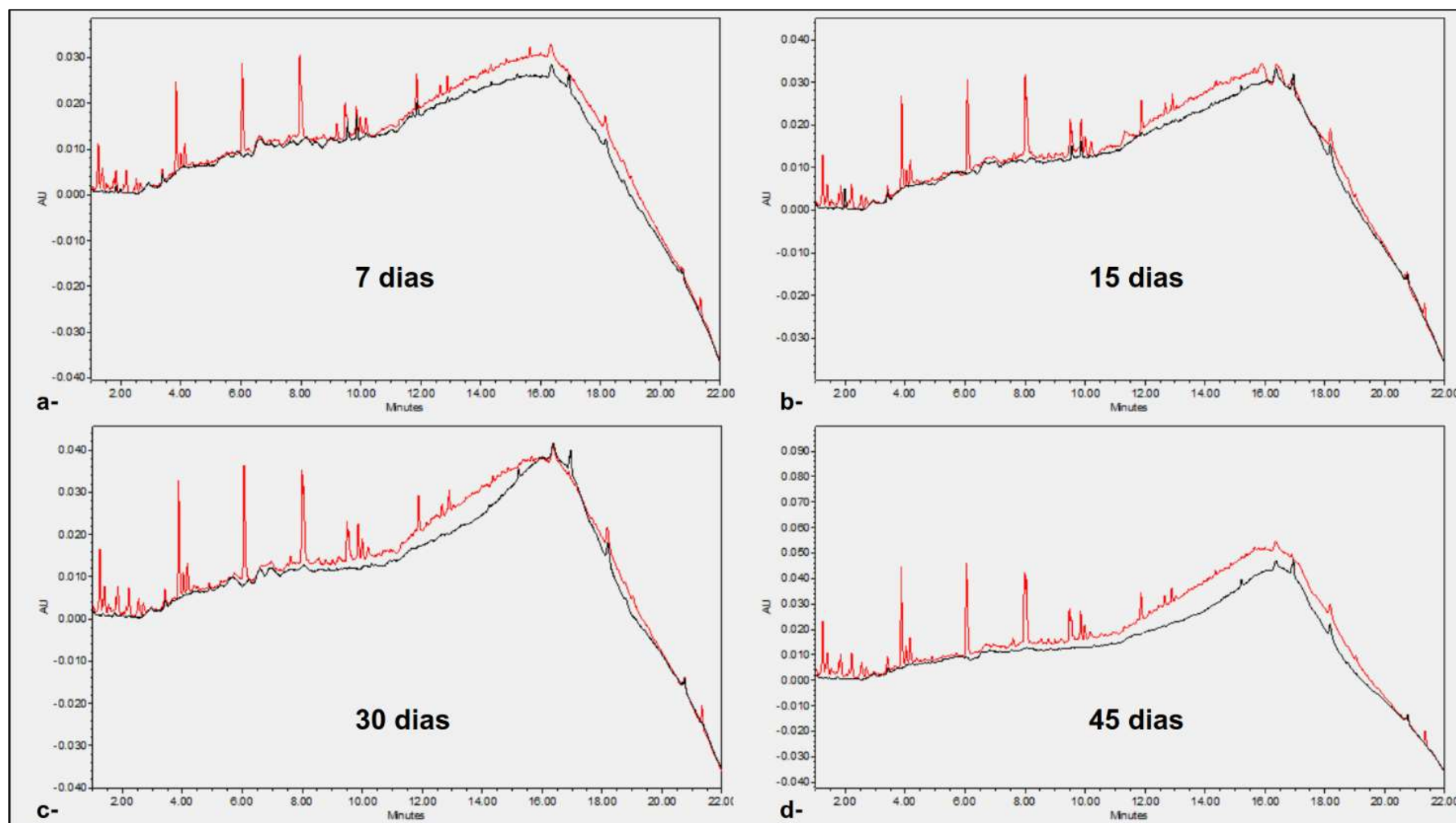


Figura 34 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC-PDA a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%*s/s*Apicum28°C, cromatograma preto) e controle negativo (cromatograma vermelho). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias.

No cromatograma (Figura 34) da análise de UPLC-PDA dos sobrenadantes de *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%*s/s*Apicum28°C) — cultivado em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — não foi possível notar picos presentes no isolado que se diferenciasssem do controle. Em 45 dias, o pico dos oligômeros estava menor em relação ao controle, entretanto próximo.

5.5.7 Cromatograma *Aspergillus niger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C)

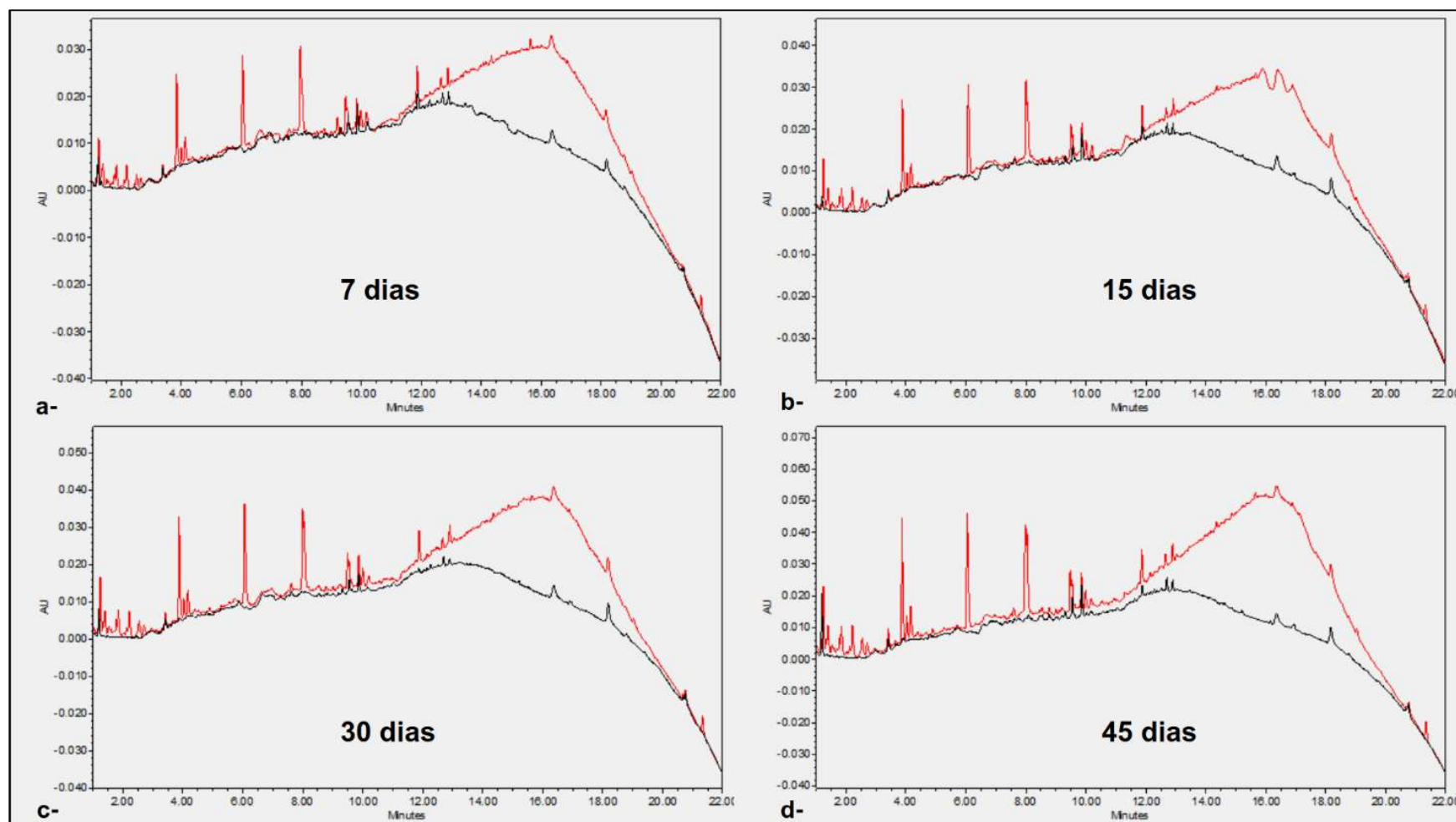


Figura 35 - Cromatograma de extratos fúngicos analisados em UPLC-PDA a 210 nm. Isolado cultivado em meio líquido Mandel's & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, em shaker a 28 °C e 200 rpm. Solventes utilizados na fase móvel: água deionizada com 0,05% (v/v) de TFA e acetonitrila

grau UPLC com 0,05% (v/v) de TFA. Análise dos sobrenadantes de *Aspergillus niger* (20MWL1%**s/sApicum28°C**, **cromatograma preto**) e controle negativo (**cromatograma vermelho**). **a-** Crescimento de 7 dias; **b-** Crescimento de 15 dias; **c-** Crescimento de 30 dias; **d-** Crescimento de 45 dias.

No cromatograma (Figura 35) de *Aspergillus niger* (20MWL1%**s/sApicum28°C**) — cultivado em meio de Mandel & Weber contendo 0,5% (m/v) de lignina kraft e 0,5% (m/v) de glicose, a 28 °C e 200 rpm — não foi possível notar picos presentes no isolado que se diferenciasssem do controle, sinalizando utilização apenas para o metabolismo. O pico dos oligômeros se mostrou bem menor em relação ao controle já em 7 e permaneceu assim até 45 dias, indicando consumo.

5.6 Produção de fitohormônios

Nos experimentos utilizando o UPLC-MS Xevo TQD para quantificação de fitohormônios AIA e moléculas reguladoras do metabolismo vegetal, foi detectada a produção dos ácidos: indol-3-ácetico, 1-metil-3-indolácetico, 5-Metoxi-3-indolácetico, 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico, 2-metil-3-indolácetico e salicílico (Anexo 10).

5.6.1 Análise de ácido indol-3-ácetico (AIA)

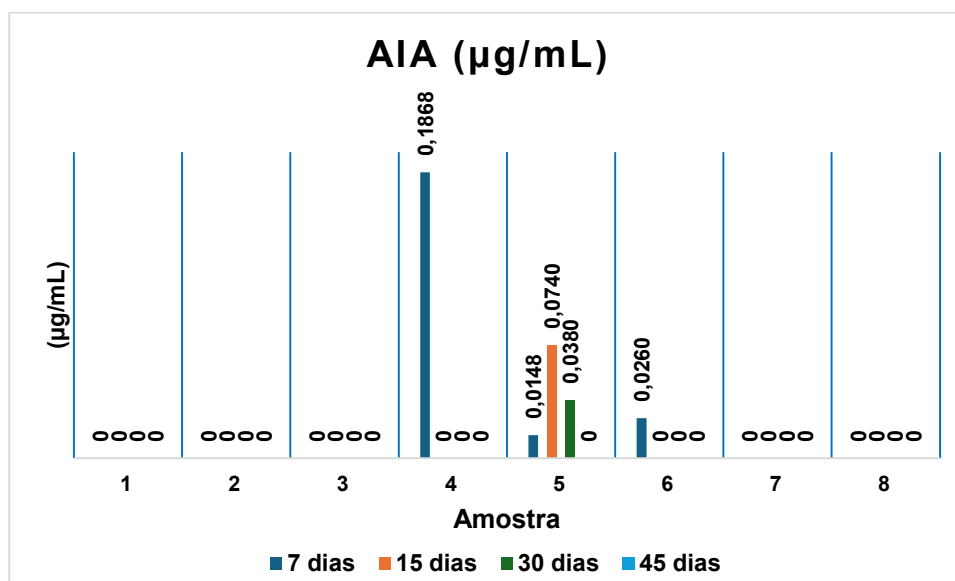


Figura 36 - Quantificação de ácido indol-3-ácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/sApicum 28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum 28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/sApicum 28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/sSalina 37°C), 5 = *Massarina sp.* (15MWL1%/sApicum 28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/sApicum 28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/sApicum 28°C) e 8 = controle negativo.

Os isolados que produziram AIA (Figura 36) foram o de *T. harzianum* (7M9L1%/sSalina 37°C) em 7 dias, *Massarina sp.* (15MWL1%/sApicum 28°C) em 7, 15 e 30 dias e *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/sApicum 28°C) em 7 dias. A maior produção de AIA foi observada para o sobrenadante do cultivo de *T. harzianum* (7M9L1%/sSalina 37°C) 0,1868 $\mu\text{g/mL}$, 7 dias.

5.6.2 Análise de ácido 1-metil-3-indolácetico

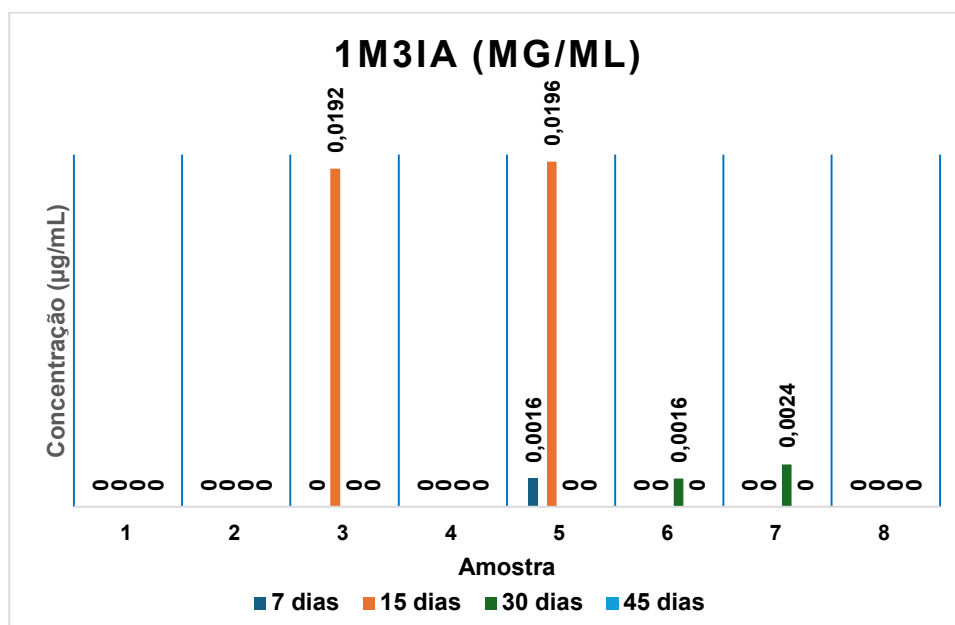


Figura 37 - Quantificação de ácido indol-3-ácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/sApicum28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/sApicum28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/sSalina37°C), 5 = *Massarina sp.* (15MWL1%/sApicum28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/sApicum28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/sApicum28°C) e 8 = controle negativo.

Segundo a Figura 37, os isolados que produziram ácido 1-metil-3-indolácetico (1M3IA) foram o de *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/sApicum28°C) em 15 dias, *Massarina sp.* em 7, 15 dias e *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/sApicum28°C) e *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/sApicum28°C) em 30 dias. A maior produção foi de *Massarina sp.* com 0,0196 $\mu\text{g/mL}$ e a segunda de *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/sApicum28°C) com 0,0192 $\mu\text{g/mL}$, ambos em 15 dias.

5.6.3 Análise de ácido 5-Metoxi-3-indolácetico

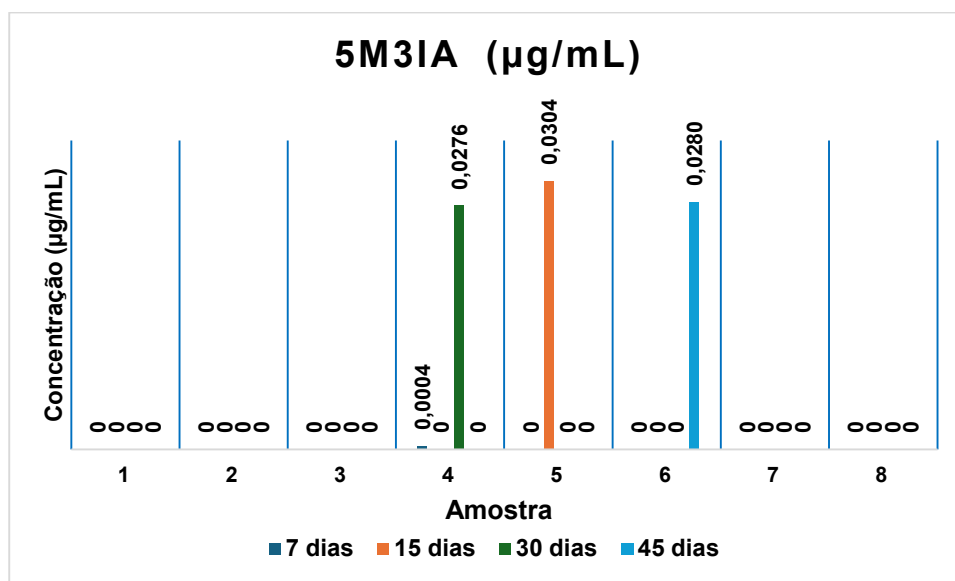


Figura 38 - Quantificação de ácido 5-Metoxi-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/s/sApicum28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/s/sApicum28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/s/sSalina37°C), 5 = *Massarina sp.* (15MWL1%/s/sApicum28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/s/sApicum28°C) e 8 = controle negativo.

De acordo a Figura 38, os isolados que produziram ácido 5-metoxi-3-indolácetico (5M3IA) foram o de *T. harzianum* (7M9L1%/s/sSalina37°C) em 7 e 30 dias, *Massarina sp.* (15MWL1%/s/sApicum28°C) em 15 dias e *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum28°C) em 45 dias. A maior produção foi de *Massarina sp.* (15MWL1%/s/sApicum28°C) com 0,0304 $\mu\text{g/mL}$ em 15 dias.

5.6.4 Análise de ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico

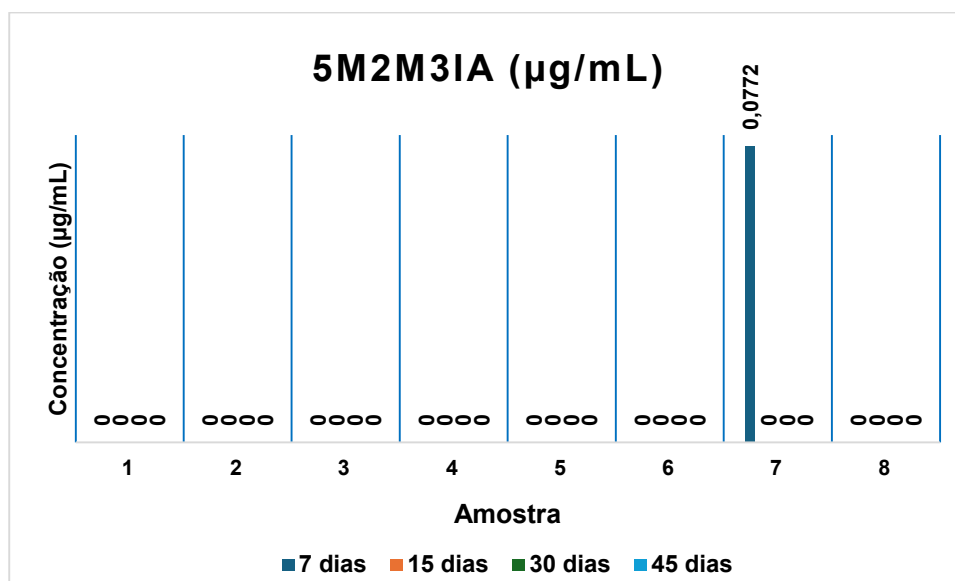


Figura 39 - Quantificação de ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/s/sApicum 28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum 28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/s/sApicum 28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/s/sSalina 37°C), 5 = *Massarina sp.* (15MWL1%/s/sApicum 28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum 28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/s/sApicum 28°C) e 8 = controle negativo.

A Figura 39 mostrou produção de ácido 5-Metoxi-2-metil-3-indolácetico (5M2M3IA) apenas no cultivo de 7 dias do isolado de *A. neoniger* (20MWL1%/s/sApicum 28°C), que produziu 0,0772 $\mu\text{g/mL}$.

5.6.5 Análise de ácido 2-metil-3-indolácetico

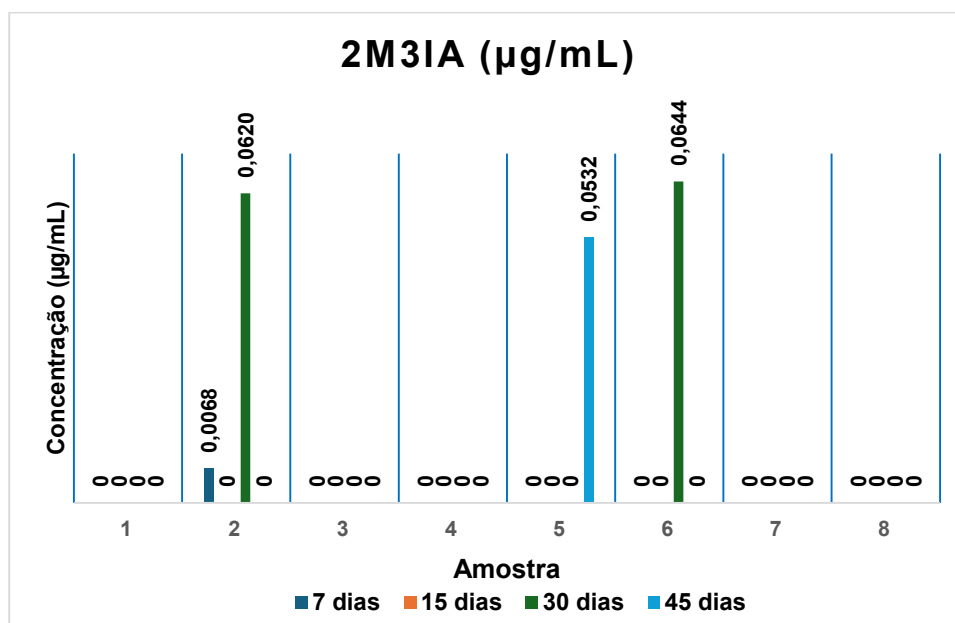


Figura 40 - Quantificação de ácido 2-metil-3-indolácetico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/s/sApicum28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/s/sApicum28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/s/sSalina37°C), 5 = *Massarina* sp. (15MWL1%/s/sApicum28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/s/sApicum28°C) e 8 = controle negativo.

De acordo com a Figura 40, os isolados que produziram ácido 2-metil-3-indolácetico (2M3IA) foram o de *L. thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C) em 7 e 30 dias, *Massarina* sp. (15MWL1%/s/sApicum28°C) em 45 dias e *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum28°C), em 30 dias. A maior produção foi de *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum28°C) com 0,0644 $\mu\text{g/mL}$, a segunda maior foi *L. thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C) com 0,062 $\mu\text{g/mL}$, ambas em 30 dias.

5.6.6 Análise de ácido salicílico

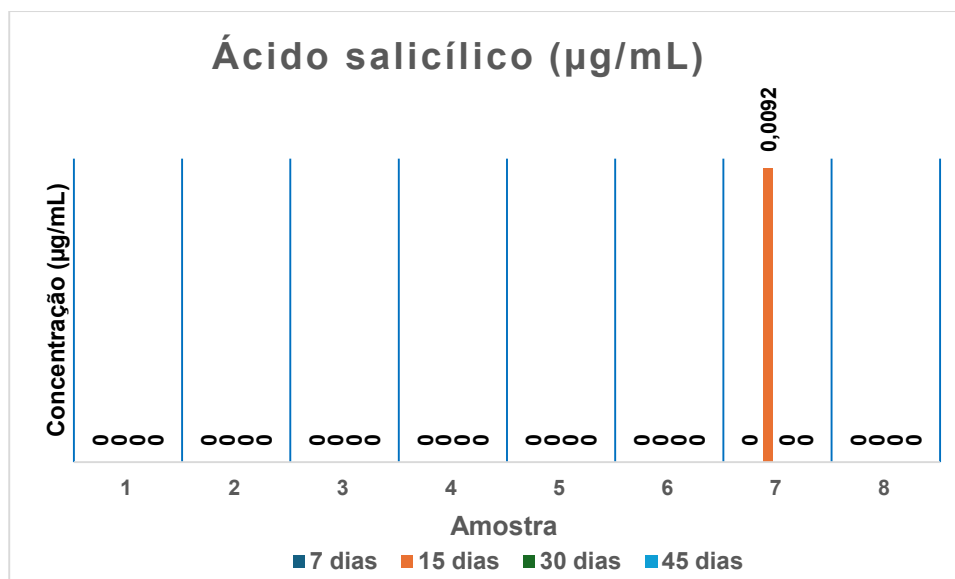


Figura 41 - Quantificação de ácido salicílico ($\mu\text{g/mL}$) no sobrenadante de fungos de ambiente hipersalino crescidos em meio Mandel's & Weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft Sigma a temperatura 28°C por 7, 15, 30 e 45 dias por espectrometria de massas. 1 = *Scedosporium ellipsoideum* (*1CZL1%/s/sApicum 28°C), 2 = *Lasiodiplodia thermobrae* (2MWL0,1%+s4,5%Apicum 28°C), 3 = *Alfoldia vorosii* (4CZL1%/s/sApicum 28°C), 4 = *Trichoderma harzianum* (7M9L1%/s/sSalina 37°C), 5 = *Massarina* sp. (15MWL1%/s/sApicum 28°C), 6 = *Peroneutypa rubiformis* (18MWL1%/s/sApicum 28°C), 7 = *Aspergillus neoniger* (20MWL1%/s/sApicum 28°C) e 8 = controle negativo.

A Figura 41 mostrou produção de ácido salicílico apenas no cultivo de 15 dias do isolado de *A. neoniger* (20MWL1%/s/sApicum 28°C), que produziu 0,0092 $\mu\text{g/mL}$.

6 Discussão

6.1 Construção da coleção de fungos filamentosos provenientes de áreas hipersalinas isolados em meios com lignina kraft como fonte de carbono

Não foi encontrado na literatura descrição de isolamento de fungos halófilos com meios com lignina como única fonte de carbono e adição de NaCl. Assim, dois experimentos foram realizados de forma a obter o maior número de isolados possível variando as porcentagens de ligninas e sal, utilizando 3 tipos de meio de cultura (M9, Mandel's & Weber e CZAPEK) e duas temperaturas (28°C e 37°C). Essa estratégia adotada implicou em diferentes níveis de pressão seletiva.

A realização de sucessivas passagens nos meios líquidos, no experimento de MENDES *et al.* (2021), favoreceu a estabilização das comunidades microbianas, então microrganismos mais capazes de sobreviver em lignina foram selecionados. A

estratégia de plaqueamento direto foi responsável por uma diversidade maior, visto que não é tão seletiva quanto a cultura de enriquecimento. A temperatura de 28 °C favoreceu mais o crescimento dos isolados fúngicos, o que era esperado pois é uma temperatura considerada adequada para o crescimento de fungos (JANNA PIETIKÄINEN; PETTERSSON; BÅÅTH, 2005); temperaturas mais altas favorecem fungos patógenos de humanos. A utilização de 3 meios de cultivo (M9, Mandel's & Weber e CZAPEK) foi importante para obtenção de uma maior diversidade, pela variedade das condições de crescimento.

Os isolados fúngicos obtidos foram influenciados por diversos fatores, desde o local de coleta até o processamento das amostras em laboratório. Entre esses fatores, destaca-se o tempo de trânsito das amostras, que ultrapassou 24 horas, o que possivelmente levou à morte dos microrganismos mais sensíveis. Condições ambientais no momento da coleta, como o clima chuvoso, também podem ter influenciado a composição microbiana. A zona Apicum, por ser adjacente ao manguezal, sofre influência tanto da maré quanto da zona Salina. Esta última, por sua vez, é uma área de contenção antrópica que já abrigou uma salina operada pela Embrapa, o que pode ter deixado resíduos com impacto na microbiota local. Além disso, alguns microrganismos presentes nas amostras podem ter exigido condições de cultivo específicas, ainda desconhecidas ou incompatíveis com as utilizadas em laboratório, o que os torna incultiváveis. Outros microrganismos, embora tenham crescido inicialmente nas placas de cultivo, não foram preservados em estoque possivelmente por dependerem de reservas metabólicas limitadas, ou por necessitarem de condições distintas para manutenção do crescimento.

O uso de lignina Kraft como única fonte de carbono impôs uma pressão seletiva significativa sobre os isolados. Logo, os meios com lignina e NaCl se tornam ainda mais restritivos e estressantes aos fungos. Então, era esperado uma redução na quantidade de microrganismos com adaptações suficientes para permitir a sobrevivência em tais condições. Os fungos isolados em Mandel's & Weber com 0,1 % de lignina (m/v) e com 11 % (m/v) de NaCl por plaqueamento direto apresentaram um crescimento mais lento, em torno de um mês, e limitado a uma pequena área da placa.

A exploração de fungos provenientes de ambientes hipersalinos é industrialmente relevante, pois esses microrganismos podem produzir enzimas

termotolerantes ou halófilas com potencial para aplicações em condições extremas. Um exemplo é a lipase halofílica de *Aspergillus niger* MH079049.1, destacada por sua aplicação na formulação de detergentes que requerem altas concentrações de cloreto de sódio (ALABDALALL *et al.*, 2021). Na indústria alimentícia, há grande demanda por enzimas capazes de atuar em diferentes condições e processos, incluindo maturação de queijos, fermentação de bebidas, processamento de frutos do mar e panificação (HMA; GARGOURI, 2024). Além de aplicações diretas para a obtenção de bioprodutos, essas enzimas são também relevantes na biorremediação de resíduos industriais, frequentemente compostos por corantes e moléculas aromáticas, os quais podem apresentar pH e salinidade extremos (FAROUK *et al.*, 2025).

6.1.1 Identificação taxonômica usando o marcador ITS

A identificação taxonômica de fungos ainda oferece muitos desafios. Embora haja extensa quantidade de sequências depositadas em bancos de dados, como o GenBank, em muitos casos estas sequências não são curadas (BELLEMAIN *et al.*, 2010). Além do Genbank, para a região ITS existem bancos de dados específicos como o UNITE e o Mycobank. O UNITE reúne sequências do INSDC (*International Nucleotide Sequence Databases Collaboration*) e de parceiros. Esse banco adota o conceito de hipótese de espécies (do inglês *species hypothesis* ou SH), no qual múltiplas sequências públicas são agrupadas e submetidas a um sistema de filtragem com o objetivo de identificar espécies descritas e ainda não descritas (ABARENKOV *et al.*, 2024).

A maior ocorrência de isolados de *Aspergillus* corrobora dados da literatura que apontam para uma grande biodiversidade do gênero, com espécies distribuídas por diferentes ambientes, principalmente o aquático (JIMÉNEZ-GOMEZ *et al.*, 2020). Outros gêneros amplamente distribuídos de forma diversa são: *Penicillium*, *Trichoderma* e *Cladosporium*.

Utilizar apenas a região ITS pode ser insuficiente para determinação taxonômica precisa para gêneros com alto grau de polimorfismo, como *Aspergillus* (CHEN *et al.*, 2017) e *Trichoderma* (SUSCA *et al.* 2020). Nesses gêneros, espécies diferentes podem apresentar um percentual de identidade da sequência ITS muito próximo e uma variação de resultados entre os bancos. Dessa forma, uma abordagem multigênica pode ser necessária para o refinamento de resultados e uma maior

aproximação com a possível identidade (EZEONUEGBU *et al.*, 2022; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2022).

Uma limitação desse estudo foi que os níveis de cobertura e identidade de alguns isolados fúngicos ficaram abaixo de 90% (4CZL1%*s/s*Apicum28°C, 7CZL1%*s/s*Apicum28°C, 6MWL0,1%*+s*11%Salina28°C e 8MWL0,1%*+s*11%Salina28°C). Levando-se em consideração a abrangência de espécies e gêneros de fungos, isto pode ter resultado em uma identificação taxonômica errônea em alguns casos.

Na árvore filogenética, *Yunnanomyces sp.* (7CZL1%*s/s*Apicum28°C) está em um clado separado dos outros isolados e da sequência de referência *Yunnanomyces pandanicola*, obtida no GenBank. Os percentuais de identidade obtidos para o isolado, no GenBank de 86% e no Unite de 84%, levantam questões a respeito de uma possível nova espécie ou que o gênero possa ser diferente do encontrado. Como é um gênero recente descrito, podem existir lacunas a seu respeito.

Entre os gêneros identificados, vários apresentam espécies endofíticas, ou seja, capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais, como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Massarina* e *Penicillium*. Considerando que as amostras de liteira continham folhas em decomposição, era esperado encontrar fungos endofíticos (MOLINA-MONTENEGRO *et al.*, 2020). Esses fungos estão associados à produção de uma ampla diversidade de metabólitos secundários (ex.: alcalóides, flavonóides e ácidos fenólicos) (ALAM *et al.*, 2021) e, em tecidos vegetais mortos, podem secretar enzimas que degradam a lignocelulose (MATTOO; NONZOM, 2022). O gênero *Fusarium* é rico em espécies endofíticas (AHMED *et al.*, 2023).

6.1.2 Identificação taxonômica usando o marcador β -tubulina

O E-value se relaciona com a significância do alinhamento entre sequências comparadas, então, quanto mais próximo o valor for de 0, mais relação com a sequência comparada. Assim, as sequências que obtiveram valor diferente podem estar longe do resultado mais aproximado encontrado no GenBank (CHOUDHURI, 2014). Os resultados do sequenciamento de β -tubulina se afastaram dos encontrados para ITS para alguns isolados fúngicos, como no caso de *Yunnanomyces sp.* (7CZL1%*s/s*Apicum28°C) que de acordo com o marcador β -tubulina seria classificado como *Caliciopsis orientalis*. Isso pode estar relacionado com o fato de que a região

ITS é mais estabelecida para identificação taxonômica molecular de fungos, com bancos que possuem mais dados disponíveis. Então gêneros recentes, como *Alfoldia* e *Halcryptovalsa*, podem não dispor de dados suficientes para uma identificação mais precisa. Para gêneros mais abundantes, como *Aspergillus* e *Penicillium*, a identificação taxonômica conta com maior disponibilidade de sequências de referência do marcador β -tubulina. Consequentemente, os resultados baseados no marcador β -tubulina apresentaram maior concordância com aqueles obtidos por meio da região ITS. Em alguns casos, a sequência do marcador β -tubulina contribuíram para uma delimitação mais precisa da espécie fúngica. Um exemplo disso é o isolado 19MWL1%*s/s*Apicum28 °C de *Aspergillus*, que havia sido identificado como *A. terreus* ou *A. hortae* com base em ITS, mas foi definido como *A. hortae* com maior segurança pelo marcador β -tubulina.

6.1.3 Identificação taxonômica usando o marcador calmodulina

Devido ao elevado número de isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* — que apresenta numerosas espécies, muitas delas geneticamente e morfológicamente muito próximas — foi necessária a utilização do marcador de calmodulina para garantir maior precisão na identificação dos isolados (SAMSON *et al.*, 2014). A árvore filogenética (Figura 19) construída para o gênero *Aspergillus* baseada no marcador calmodulina permite dar enfoque que dentro do gênero há uma diversidade considerável em que algumas espécies se distanciam bastante de outras como *A. sydowii* (1MWL0,1%+4,5%*s/s*Apicum28°C) e *A. pseudonominae* (4MWL1%*s/s*Salina28°C, 5MWL1%*s/s*Salina28°C e 4M9L1%*s/s*4,5%Apicum37°C).

6.1.4 Revisão da literatura para os gêneros dos isolados identificados

6.1.4.1 *Alfoldia*

Até o momento, não há registros sobre a produção de biomoléculas por espécies desse gênero. As informações disponíveis referem-se apenas a estudos taxonômicos recentes. Duas espécies foram descritas: *A. vorosii*, isolada de *Juniperus communis*, uma espécie de arbusto (CROUS *et al.*, 2019), e *A. lenyadriensis*, isolada do intestino do besouro *Platynotus* sp. (CROUS *et al.*, 2024). Esse inseto é detritívoro e se alimenta de matéria orgânica, como folhas e madeira (VELASQUEZ *et al.*, 2025).

O gênero apresenta relação filogenética com *Massarina*. Ambos pertencem à ordem Pleosporales, uma das maiores da classe Dothideomycetes (YU; ZHANG; LIU, 2022).

6.1.4.2 *Aspergillus*

Fungos do gênero *Aspergillus* são naturalmente encontrados em vários ambientes, principalmente aquáticos (ORFALI *et al.*, 2021). Algumas espécies aquáticas podem produzir interessantes metabólitos com propriedades antimicrobianas, como a fumagilina isolada de *Aspergillus fumigatus* H22 (LI; FU; SONG, 2023).

Alguns são conhecidos por serem patógenos oportunistas, como *Aspergillus fumigatus*. Este está entre os patógenos mais prevalentes em ambientes hospitalares e causa aspergilose em pessoas com sistema imunocomprometido, como pacientes transplantados (KANAUJIA; SINGH; RUDRAMURTHY, 2023). O sistema imune de pessoas imunocompetentes facilmente elimina os conídios de *Aspergillus fumigatus* que estão presentes no ar, uma vez que as imunidades inata e adaptativa atuam de forma eficiente (LATGÉ, 1999; GU *et al.*, 2021; SZALEWSKI *et al.*, 2018).

Na literatura, o gênero vem sendo explorado quanto ao potencial lignocelulítico há algumas décadas (DUARTE; FERREIRA, 1994; MILSTEIN *et al.*, 1984). Indícios sugerem que algumas espécies podem estar envolvidas com a desconstrução desse polímero aromático. A exemplo do *Aspergillus flavus* que apresenta atividade de enzimas lignocelulósicas como lacase e LiP (LI *et al.*, 2020).

6.1.4.3 *Cladosporium*

Gênero com uma distribuição ubíqua, algumas espécies podem ser patógenas de plantas ou de humanos, outras contaminantes laboratoriais, mas também podem ser exploradas de forma a propiciar benefícios à sociedade pela produção de metabólitos bioativos (MOHAMED; IBRAHIM, 2021), como macrolídeos com propriedades antimicrobianas (WANG *et al.*, 2020). Outras aplicações também são interessantes, como degradação de polietileno de baixa densidade por *C. sphaerospermum*. Também foram encontradas atividades de lacase, Lip e MnP (SATHIYABAMA *et al.*, 2024). Uma cepa de *Cladosporium*, nomeada BF-F, foi isolada das raízes de *S. portulacastrum* e apresentou influência no estímulo do crescimento

da planta. A análise genômica do isolado levou à identificação de genes ligados a biossíntese de triptofano (YANG *et al.*, 2023).

6.1.4.4 *Fusarium*

Espécies do gênero causam a patogênese fusariose que pode afetar pessoas imunocomprometidas, animais e plantas (BATISTA *et al.*, 2020). Em contraste a esse aspecto negativo, também são produtores de biomoléculas de valor agregado. Como pigmentos com aplicações médicas, ex. bicaverina produzida por *F. oxysporum* que demonstrou atividade antioxidante (PESSÔA *et al.*, 2017), e metabólitos secundários bioativos, ex. o composto *Fusaramin* produzido por *Fusarium* sp. FKI-7550 com atividade antimicrobiana (AMUZU *et al.*, 2024).

6.1.4.5 *Halocryptovalsa*

O gênero é recente e inclui espécies isoladas de plantas e folhas mortas em ambientes salinos. Entre as espécies descritas, destaca-se *H. endophytica*, isolada de tecidos da planta halófito *Salicornia patula* (DELGADO; NAU; MACIÁ-VICENTE, 2023). Outro exemplo é *H. avicenniae*, isolada de *Avicennia marina* (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2017).

6.1.4.6 *Hortaea*

Gênero composto por leveduras negras, encontradas em condições extremas, como *H. acidophila* isolada na presença de ácidos húmicos e fúlvicos em pH 0,6 (HÖLKER *et al.*, 2004) e *H. werneckii* geralmente encontrada em ambientes hipersalinos (NISHIMURA & MIYAJI, 1984). Esta é um microrganismo dimórfico que dependendo da salinidade pode alterar para a forma micelial ou leveduriforme. Nesta última, pode causar a patologia *Tinia nigra* (RIZK; MAGDY, 2022), uma dermatomicose rara, que se manifesta na camada mais superficial da pele através de microlesões, caracterizando-se pela presença de manchas hiperpigmentadas, normalmente na palma das mãos e planta dos pés (SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2025). Ela consegue resistir a concentrações altas de salinidade devido ao acúmulo de glicerol e outros compostos orgânicos por alterações na membrana e presença de melanina na parede celular (KEJŽAR *et al.*, 2013). A melanina produzida por *H. werneckii* tem sido explorada quanto a potenciais aplicações em diferentes áreas em busca de uma

opção mais econômica que o uso de melanina sintética. A exemplo de um estudo em foram testadas atividades antifúngica e antimicrobiana, com melhores resultados na inibição de *A. niger* e bactérias gram positivas (ELSAYIS *et al.*, 2022). Também foi avaliado o potencial de biorremediação pela adsorção de metais pesados, com bons resultados em Ni^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} (ELSAYIS *et al.*, 2022).

6.1.4.7 *Lasiodiplodia*

A *Lasiodiplodia theobromae* é um fitopatógeno comum em regiões tropicais, que causa a podridão de raiz em uma ampla variedade de espécies de plantas, a exemplo do abacateiro e da mandioca e está associado a prejuízos na agricultura no país (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Porém, estudos relatam que este fungo, quando crescido em bagaço de cana de açúcar, formam polímero, o Lasiodiplodan que é uma β -glucana que possui propriedades terapêuticas, como melhora na cicatrização e antioxidantes (ABDESHAHIAN *et al.*, 2021). CAO *et al.* (2020) relataram a degradação de benzo(a)pireno por *Lasiodiplodia theobromae*, isolado de um solo contaminado por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na China. A presença de enzimas lignocelulolíticas, especialmente a lignina peroxidase (LiP), desempenhou um papel importante nesse processo.

6.1.4.8 *Massarina*

Várias espécies de *Massarina* sp. foram encontradas em ambientes aquáticos, principalmente em mangues e pântanos (KHYDE, 1989; DEVADATHA *et al.*, 2019). ABDEL-WAHAB *et al.* (2007) encontrou dois novos metabólitos produzidos pelo isolado *Massarina* sp. (strain CNT-019), *spiromassaritone* e *massariphenone*. O primeiro apresentou efeito citotóxico em testes utilizando as linhagens celulares: LO2, HepG2 e MCF7 (UZMA *et al.*, 2018) e outro exibiu uma pequena atividade antimicrobiana (YOU *et al.*, 2009). A literatura para ambos ainda é limitada e requer mais estudos.

6.1.4.9 *Metarhizium*

O gênero apresenta grande diversidade de espécies que habitam o solo e é reconhecido por seu papel como entomopatógeno, sendo amplamente utilizado no Brasil no controle de cigarrinhas que causam danos às plantações de cana-de-açúcar

(IWANICKI *et al.*, 2019). Além do uso no controle biológico, sua aplicação como bioinoculante tem crescido, uma vez que espécies como *M. robertsii*, *M. brunneum* e *M. humberi* demonstraram capacidade de estimular o crescimento vegetal (Mesquita *et al.*, 2023). Estudos conduzidos em cultivos de café e tomate, por meio da irrigação do solo, bem como na inoculação de sementes de feijão, evidenciaram efeitos positivos sobre o desenvolvimento das plantas (MESQUITA *et al.*, 2023). Em determinadas condições, tais efeitos foram acompanhados pela proteção contra fitopatógenos, incluindo *Leucoptera coffeella* (FRANZIN *et al.*, 2022). Ademais, um estudo conduzido por Siqueira *et al.* (2020) detectou a produção do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA), tanto na presença quanto na ausência de triptofano, sendo que, em alguns casos, os níveis produzidos foram superiores ao controle positivo (*Trichoderma harzianum*).

6.1.4.10 *Penicillium*

Gênero com grande diversidade que é facilmente encontrado na natureza. É conhecido principalmente devido à descoberta do antibiótico penicilina por Alexander Fleming em 1928 (GAYES, 2017). As espécies de *Penicillium* possuem grande potencial biotecnológico, como o *Penicillium citrinum* que produz bioativos farmacêuticos (LINDSAY; KINGHORN; RAKOTONDRAIBE, 2023). Além disso, algumas espécies como *P. mallochii*, *P. simplicissimum* e *P. ochrochloron*, produzirem enzimas que podem ser utilizadas em indústrias têxteis, como lacases, xilanases e lignina peroxidases (SINGH; KHAJURIA, 2018; MORSY; CLECKLER; ARMUELLES-MILLICAN, 2020).

6.1.4.11 *Peroneutypa*

Algumas espécies do gênero foram isoladas a partir de madeira em decomposição, podem causar prejuízos em plantações, há relato do crescimento em figueiras no Irã, causando lesões nas plantas (GHAEDI; BOLBOLI; MOSTOWFIZADEH, 2023). A literatura sobre bioprodutos é restrita, entretanto, há a descrição de uma lacase de *Peuroneutypa scoparia* que foi utilizada na descoloração de corantes de couro por PANDI *et al.* (2019) e também no branqueamento de madeiras (PANDI; GOWTHAMAN; KAMINI, 2021).

6.1.4.12 *Phaeosphaeria*

Apesar de muitas espécies do gênero serem patógenas de plantas e causarem pragas, como a mancha branca do milho pela *Phaeosphaeria maydis*, com casos em plantações no Brasil (COSTA, 2013), e mancha gluma no trigo, eles despertam interesse quanto a produção de biomoléculas. Um estudo de revisão conduzido por El-Demerdash (2018) sistematizou a ocorrência de 71 metabólitos microbianos com atividades biológicas distintas, incluindo compostos citotóxicos e antifúngicos. Entre aqueles com potencial citotóxico, destacam-se o *Pyranospartinol* (ELSEBAIA *et al.*, 2015), o *Spartinol C* (ELSEBAIA *et al.*, 2009) e a série de *Phaeosphaerins A–F* (Li *et al.*, 2012). Alguns metabólitos com atividade antifúngica descritos foram o *Phaeofungin* (SINGH *et al.*, 2013) e a *Rousselianone A* (XIAO *et al.*, 1993). A literatura relacionando fungos do gênero com diretamente com desconstrução de lignina não dispõe de muito conteúdo, há um artigo com *Phaeosphaeria spartinicola* atuando no afinamento da parede celular rica em lignocelulose de uma gramínea marinha (NEWELL; PORTER; LINGLE, 1996).

6.1.4.13 *Pseudallescheria* ou *Scedosporium*

Anteriormente *Pseudallescheria* e *Scedosporium* eram agrupados juntamente, sendo o primeiro a forma sexuada o outro assexuada, depois ocorreu uma separação taxonômica em dois gêneros distintos. Entretanto, em 2014, todas espécies de *Pseudallescheria* passaram a ser consideradas *Scedosporium* e a nomenclatura anterior caiu em desuso (LACKNER *et al.*, 2014). Fungos deste gênero podem ser encontrados no solo e em ambiente aquático. São causadores de patogênese em humanos, afetando pessoas com o sistema imune não competente, como *Scedosporium boydii* que pode ser facilmente encontrado nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística (GHAMRAWI *et al.*, 2015). Em um estudo recente, foi apontado o envolvimento do gênero com a desconstrução de biomassa lignocelulósica, com detecção das atividades de peroxidases e oxidases. O cultivo em meio com lignina se provou um indutor melhor que aquele utilizando glicose como fonte de carbono (POIRIER; BOUCHARA; GIRAUD, 2023). Também foi realizada uma análise do genoma quanto à expressão das enzimas e resultados de qPCR revelaram uma expressão maior dos genes relacionados às enzimas na presença de lignina no meio de cultivo (POIRIER; BOUCHARA; GIRAUD, 2023).

6.1.4.14 *Trichoderma*

Fungos do gênero *Trichoderma* são empregados no controle biológico protegendo plantas de patógenos como nematoides e outros fungos. Podem também ser benéficos agindo como biomoduladores para o crescimento de plantas pela produção de fitohormônios, como auxina e giberelina, e indução de resistência a patógenos (YAO *et al.*, 2023; MARTINEZ *et al.*, 2023). A interação positiva entre o *Trichoderma* e a planta contribui para uma agricultura mais sustentável com a redução de utilização de agrotóxicos (WOO *et al.*, 2023).

Fungos do gênero têm demonstrado potencial em aplicações relacionadas a desconstrução de lignina (RYAZANOVA; CHUPROVA; LUNEVA, 2015). A exemplo de um trabalho em que cepas de *Trichoderma*, isoladas de compostos a partir de biomassa lignocelulosicos, foram empregadas no tratamento de resíduos industriais da precipitação de lignina com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico (BOHACZ; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, 2020). Os resultados demonstraram eficiência na descoloração dos efluentes residuais, atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) e xilanase, além da produção de compostos de baixo peso molecular, como ácido vanílico e siringaldeído (BOHACZ; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, 2020).

6.1.4.15 *Yunnanomyces*

Há na literatura apenas artigos com descrições taxonômicas e descrição sobre isolamentos, havendo 7 espécies descritas, em grande parte provenientes de tecidos de plantas. A primeira espécie foi descrita em 2018, *Yunnanomyces pandanicola* (TIBPROMMA *et al.*, 2018), e as últimas em 2024, *Y. panamaensis* (CROUS *et al.*, 2024), *Y. hagahagaensis* (CROUS, WINGFIELD *et al.*, 2024), *Y. mangrovei* (ZHANG *et al.*, 2014) e *Y. sexualis* (ZHANG *et al.*, 2024).

6.1.4.16 *Zymoseptoria*

O gênero pode causar patogênese em plantas, como trigo, levando a mancha *Septoria tritici*, ou mancha salpicada, que se caracteriza por manchas cloróticas em folhas jovens (STUKENBROCK *et al.*, 2012). A espécie *Z. tritici* é a mais conhecida do gênero, responsável por prejuízos consideráveis em plantações na Europa. Este é

um fungo dimórfico que, dependendo das condições, pode assumir forma leveduriforme ou filamentosa (FRANCISCO *et al.*, 2019).

6.2 Ligninas industriais

Ligninas industriais possuem composição variável, diferentemente da lignina Kraft Sigma que é pura. Logo, o crescimento mais robusto nelas pode sugerir que os fungos estão utilizando outras fontes de carbono além da lignina, no caso algum contaminante presente na lignina industrial (ex.: compostos fenólicos simples, como ácido 4-hidroxibenzoico, e açúcares residuais). Visando aplicações reais em condições industriais, em que a lignina vai estar em um estado mais bruto, e que a cada processo a composição pode mudar. A capacidade dos isolados de crescerem em ligninas industriais é um indicativo positivo nesse sentido.

Os fungos isolados com meio com 11% de NaCl (m/v) e 0,1% (m/v) de lignina apresentaram uma limitação quanto ao crescimento em uma porcentagem maior de lignina, alguns, como *Halocryptovalsa sp.*, não cresceram em nenhum dos meios com 1% (m/v) de lignina em 30 dias. Isso possivelmente tenha relação com as condições de isolamento, então talvez precisem de sal para crescer ou não suportem uma concentração maior de lignina no meio.

Analisando os dados dos crescimentos com e sem adição de NaCl e a variação de lignina algumas questões são levantadas, como todos os fungos terem crescido em todos os meios com a adição de sal, se isso poderia ser relacionado a halofilicidade de alguns isolados. Outro ponto foi o aumento no número de fungos que cresceram melhor em apenas ligninas indústrias que subiu de 10 para 14. Eles podem talvez estarem usando as impurezas das ligninas indústrias no metabolismo frente a salinidade do meio.

6.3 Crescimento em compostos fenólicos

A forma como ocorre o transporte de compostos fenólicos para o interior celular fúngico não é totalmente descrita, existem evidências da possível utilização de transportadores pertencentes a *Major Facilitator Superfamily* (Superfamília dos Principais Facilitadores) (CILLINGOVÁ, *et al.* 2017, LERICHE-GRANDCHAMP *et al.*, 2020). Essa superfamília transportadora é formada por proteínas de membrana que realizam transporte ativo secundário ou agem como facilitadores passivos (VARELA

et al., 2023). O crescimento da maior parte dos isolados fúngicos nos ácidos vanílico e 4-hidroxibenzoico é um resultado importante quando se visa a desconstrução de lignina, pois são compostos que podem ser gerados no processo, então a metabolização deles pode ser necessária. Os ácidos vanílico e 4 hidroxidobenzoico podem ser precursores do ácido protocatecuico, este depois pode ser transformado em catecol (KUTRAITE; AUGUSTINIENE; MALYS, 2025), que está localizado mais próximo do metabolismo central da lignina. O menor crescimento dos isolados fúngicos de ambiente hipersalino na presença de catecol pode ter sido causado por esse composto ser tóxico para microrganismos, atuando rompendo a membrana plasmática (XIE *et al.*, 2024). Entretanto, alguns microrganismos possuem as enzimas necessárias para degrada-lo, sendo a desconstrução desse composto importante para o aproveitamento da lignina. Os dados mostram que talvez a maior parte dos isolados consigam atuar mais no início da desconstrução de lignina, exceto para todos isolados de *Aspergillus* que conseguiram obter um bom crescimento em catecol.

6.4 Ensaios enzimáticos de lacase

Por ser a lignina uma macromolécula complexa, os fungos precisam secretar enzimas extracelulares para convertê-la em moléculas menores. A avaliação da atividade de enzimas ligninolíticas é importante para identificar microrganismos capazes de modificar a estrutura da lignina e, conseqüentemente, produzir bioprodutos que podem ser caracterizados por UPLC (CHRISTOPHER; YAO; JI 2014). Nesse contexto, testes para medir a atividade de lacase são amplamente utilizados em fungos associados à desconstrução da lignina, uma vez que altas atividades enzimáticas geralmente estão relacionadas a uma maior eficiência nesse processo (CHRISTOPHER; YAO; JI 2014; LEONOWICZ *et al.*, 2001; BRIJWANI; RIGDON; VADLANI, 2010).

Durante os cultivos de micélio em meio líquido para os ensaios enzimáticos, alguns fungos cresceram de forma robusta e alteraram o meio, como os isolados de *Aspergillus*, principalmente *A. neoniger* (20MWL1%/sApicum28°C), que visualmente ficou com cor mais límpida em comparação ao controle negativo, este composto por meio Mandel's & weber com 0,5 % (m/v) de lignina Kraft sem inóculo (Figura 42). Outro aspecto notado foi que os sobrenadantes dos isolados 4CZL1%/sApicum28°C

(*Alfoldia vorosii*) e 10CZL0,1%+4,5%*sApicum*28 °C (não identificado) exalaram um odor semelhante ao petricor, o cheiro associado quando a água da chuva umedece o solo seco, levando à liberação de compostos voláteis, como a geosmina, devido a processos metabólicos de microrganismos (ROUSSEAU *et al.*, 2014).

A tabela e o gráfico apontam dias diferentes de maior produção de lacase para cada isolado fúngico, o que pode estar relacionado a cada um pertencer a um gênero diferente. O controle positivo usado foi a enzima concentrada de *Pleurotus ostreatus*, conhecidamente produtor de lacase, logo, era esperado que esta atividade fosse ser bem superior àquela dos isolados. Recentemente foi feito um estudo explorando enzimas lignolíticas e *Scedosporium*, com detecção da atividade de lacase (POIRIER; BOUCHARA; GIRAUD, 2023).

Considerando a diversidade de gêneros encontrada, as condições que favorecem a produção de lacase vão ser heterogêneas. Portanto, seria necessário experimentos mais amplos para se determinar as condições que maximizam a produção de lacases.



Figura 42 - *Aspergillus niger* (20MWL1%*s/sApicum*28°C) e controle negativo sem inóculo (foto da direita) em meio Mandel's & Weber com 0,5% (m/v) de lignina Kraft e 0,5% (m/v) de glicose. 24 h de crescimento em shaker a 28 °C e 200 rpm (Foto: autoria própria, 2025).

Os isolados de *A. niger* (14MWL1%*s/sApicum*28°C e 20MWL1%*s/sApicum*28°C) alteraram o meio de cultura de forma significativa, com 24 horas o meio originalmente de cor opaca marrom em uma cor clara translúcida (Figura 24). Embora estes não tenham apresentado atividade de lacase, a lignina presente no meio pode ter sido quebrada por outras enzimas lignolíticas. Em um trabalho com *A. niger*, foi demonstrado o potencial deste na despolimerização de lignina devido ao

gene que codifica a enzima vanilina desidrogenase (VhdA) (LUBERS *et al.*, 2024). Este ao ser inativado no estudo levou à diminuição no crescimento dos fungos em aldeídos aromáticos relacionados a despolimerização de lignina (LUBERS *et al.*, 2024).

6.5 Análises UPLC-PDA e UPLC- MS Xevo TQD

Por limitações de tempo e equipamento, um total de 7 isolados fúngicos de ambiente salino foram escolhidos para análise de metabólitos. Os critérios utilizados para a escolha desses 7 isolados foram diversos: (i) resultados positivos de atividade de lacase; (ii) alteração da coloração de meio de cultivo líquido contendo lignina, sugerindo modificação química ou consumo do polímero; (iii) crescimento robusto em ligninas industriais, indicando potencial para aplicação biotecnológica; (iv) evidências na literatura de que outras espécies do mesmo gênero são capazes de desconstruir lignocelulose; e (v) pertencimento a um gênero com informações limitadas disponíveis na literatura quanto a usos potenciais. Especificamente, foram selecionados três isolados fúngicos que apresentaram os melhores resultados nos testes enzimáticos de lacase: 4CZL1%*s/s*Apicum28°C (*Alfoldia vorosii*), *1CZL1%*s/s*Apicum28°C (*Scedosporium ellipsoideum*) e 18MWL1%*s/s*Apicum28°C (*Peroneutypa rubiformis*). Um isolado do gênero *Aspergillus* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C) também foi incluído por ter promovido alteração na coloração do meio durante os crescimentos para os testes enzimáticos (Figura 42), indicando possível consumo ou modificação da lignina. O isolado 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C (*Lasiodiplodia theobromae*) foi escolhido por apresentar crescimento robusto em placas contendo meio sólido Mandel's & Weber com ligninas industriais (Figura 20 e Figura 21). Além disso, foi incluído um isolado pertencente ao gênero *Trichoderma*, amplamente descrito na literatura por sua capacidade de desconstruir lignocelulose: *T. harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C). Por fim, também foi escolhido o isolado fúngico 15MWL1%*s/s*Apicum28°C (*Massarina sp.*), este pertencente a gênero cuja literatura disponível aborda alguns metabólitos secundários produzidos, mas de forma limitada e alguns estudos foram publicados a mais de 20 anos atrás.

Nesse trabalho foi utilizada a técnica cromatográfica com abordagem *untargeted* UHPLC-PAD, para obter o perfil cromatográfico dos sobrenadantes

fúngicos selecionados em seus respectivos meios de cultivo e a abordagem denominada *targeted* UHPLC-MS com detector triplo quadrupolo Xevo TQD para detectar e quantificar os compostos presentes nas misturas fúngicas complexas.

Na primeira abordagem, dita “não direcionada”, o objetivo é conhecer o perfil químico das amostras investigadas (sobrenadante da cultura fúngica versus controle negativo não inoculado). Neste caso, se compara os cromatogramas obtidos com o UHPLC-PAD, buscando picos que sejam diferentes entre as amostras e o controle. Esta técnica, por si só, não permite a identificação de compostos desconhecidos presentes na matriz biológica analisada, mas oferece a possibilidade de inferir a classe química dos metabólitos presentes nas amostras por meio da análise dos espectros de absorção na região do ultravioleta visível (200-400 nm) dos picos selecionados.

Na segunda abordagem, a “direcionada”, o objetivo é a identificação de compostos analisados, no caso os fitormônios (ex.: auxina, ácido giberélico e ácido abscísico) ou moléculas reguladoras de defesa vegetal (ex.: ácido salicílico), entre outros. Nesse caso, o espectrômetro de massas requer a preparação de curvas de calibração com os padrões analíticos de referência numa faixa de concentrações previamente definida visando a quantificação dos compostos de interesse. A detecção é realizada em modos de ionização seletivos, com foco em razões massa/carga (m/z), tempo de retenção e cromatogramas já conhecidos, de forma a revelar a presença e/ou ausência dos fitormônios nas amostras (LI; JIAN; LIU *et al.*, 2022).

6.6 Análises dos sobrenadantes fúngicos por UPLC-PDA

Nenhum isolado apresentou os picos indicados por setas azuis, na Figura 28, que estavam presentes no controle, representando possivelmente unidades de lignina liberadas da estrutura principal. Logo, os fungos podem estar consumindo estes metabólitos representado pelos picos para funções metabólicas.

Lasiodiplodia theobromae (2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C) e *Alfoldia vorossi* (4CZL1%+s/sApicum28°C) aparentam produzir o mesmo pico com tempo de retenção de $\pm 1,98$ min e antes de 45 dias param de produzir, o que possivelmente indica que o composto pode estar sendo utilizado para manter o metabolismo. O isolado de *T. harzianum* (7M9L1%+s/sSalina37°C) foi o que mais apresentou picos que se mantiveram por 45 dias, o que pode indicar possíveis compostos produzidos a partir

de lignina, logo, pode estar de acordo com a literatura que indica a capacidade de utilização de biomassa ligninocelulósica pelo gênero (BOHACZ; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, 2020).

A ligação direta da espécie *A. neoniger* (20MWL1%/s/sApicum28°C) com desconstrução de linina não está bem reportada na literatura, mas existem trabalhos envolvendo outras espécies do gênero, como *Aspergillus niger* que é bem aproximado geneticamente. Um artigo de revisão sobre o gênero *Aspergillus*, cita um experimento em que foi crescido *A. niger* em meio de cultura com 1% (m/v) de lignina Kraft comercial e com 6 dias de cultivo quase toda lignina do meio foi removida, foi levantada a hipótese de adsorção pelos micélios (DUARTE; FERREIRA, 1994). Portanto, a capacidade do isolado de *A. neoniger* (20MWL1%/s/sApicum28°C) em relação à utilização dos oligômeros de lignina abre espaço para possíveis aplicações na biorremediação de compostos poluentes, como corantes e compostos aromáticos.

6.7 Análise de fitohormônios UPLC-MS Xevo TQD

Uma abordagem direcionada (*targeted*) foi usada nos experimentos de UPLC-MS Xevo TQD para quantificação de fitohormônios e molécula reguladoras no metabolismo de plantas (ácido salicílico).

Os controles negativos contendo apenas meio de cultura sem inóculo fúngico apresentaram resultados positivos para as seguintes análises: AIA, em todos controles, 1M3IA, nos controles de 7, 30 e 45 dias, 5M3IA, 2M3IA, ambos apenas no controle negativo de 7 dias, e 5M2M3IA, nos controles de 30 e 45 dias. Então, para os isolados que obtiveram produção desses fitohormônios, foi realizada a subtração pelo valor do controle correspondente ao fitohormônio e período de avaliação. Algumas possibilidades podem ser levantadas, como contaminação cruzada da lignina utilizada como fonte de carbono, pois fitohormônios estão presentes em plantas e a lignina é extraída destas. Também pode ser algum outro metabólito com composição parecida ou algum erro durante a operação do equipamento.

A maior produção de AIA por *T. harzianum* (7M9L1%/s/sSalina37°C) vai de acordo com a literatura envolvendo diferentes espécies do gênero a produção de AIA (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CHAGAS; CHAGAS JUNIOR; CASTRO, 2017). O potencial de produção de AIA por isolados da coleção pode ser testado em experimentos mais

direcionados com condições propícias, como adição de triptofano ao meio, utilização de todos *Trichoderma* isolados e condições de cultivo mais específicas.

Os fitohormônios 1M3IA, 5M3IA são derivados de AIA, então a maior produção por *Massarina sp.* (15MWL1%*s/s*Apicum28°C) é uma adição a literatura do fungo, que não tem relatada qualquer envolvimento com a produção de tal composto. 5M2M3IA e 2M3IA são análogos estruturais de AIA, então possuem estrutura semelhantes, porém com algumas mudanças em alguns grupos, existe reportado a produção de AIA para *A. niger*, quanto ao gênero *Peroneutypa* não há dados relatados (BİLKAY; KARAKOÇ; AKSÖZ, 2010). A detecção de ácido salicílico possivelmente está relacionada com a produção para utilização em vias metabólicas de *A. neoniger*, um estudo faz a relação de utilização desse composto para produção de catecol e este em ácido *cis*, *cis* -mucônico (LUBBERS *et al.*, 2021).

7 Conclusões

A utilização da lignina Kraft como única fonte de carbono, aliada à variação da salinidade nos meios de cultivo, permitiu a seleção de 35 isolados fúngicos com potencial biotecnológico, capazes de sobreviver e se adaptar às pressões seletivas impostas pelas condições experimentais. Mesmo que a maior parte dos fungos tenha sido isolada em meio Mandel's & Weber com 1% (m/v) de lignina Kraft e ausência de NaCl, em experimentos posteriores todos fungos cresceram em condições hipersalinas e grande parte deles com aspecto robusto.

O meio de cultivo Mandel's & Weber, associado à temperatura de 28 °C, mostrou-se adequado para o crescimento da maioria dos isolados obtidos. A formação de uma coleção fúngica sob essas condições aumenta a probabilidade de identificar microrganismos com potencial para transformar a lignina, resultando em biomoléculas de interesse industrial. Além disso, os isolados tolerantes a altas concentrações salinas podem ser aplicados tanto em processos industriais sob condições extremas quanto no desenvolvimento de bioinsumos voltados ao aumento da tolerância à salinidade em plantas.

Frente aos desafios da identificação molecular as análises mais amplas realizadas com marcadores secundários (β -tubulina e calmodulina) pode auxiliar no refinamento de resultados obtidos no sequenciamento primário utilizando ITS. A definição final quanto a espécie para cada isolado foi realizada levando em consideração o conjunto de análises, as árvores filogenéticas, marcadores em que a qualidade estava melhor e para alguns em que o percentual de identidade ou cobertura não foram considerados suficientes se optou por manter uma identificação apenas quanto a gênero, como *Yunnanomyces sp.* Então quanto a espécie foram identificados 27 isolados fúngicos e para 5 se optou para a identificação apenas a nível de gênero.

A diversidade de gêneros observada refletiu, em parte, a complexidade da microbiota, mesmo sob condições restritivas, nas quais a lignina Kraft foi utilizada como única fonte de carbono e, em alguns casos, associada à hipersalinidade do meio. A identificação de espécies sem associação direta previamente descrita com a desconstrução da lignina, mas que ainda assim apresentaram crescimento nesse substrato, aponta para novas perspectivas de investigação. Tais achados podem contribuir para o avanço do entendimento dos mecanismos de degradação da lignina por microrganismos pouco explorados. Além disso, o presente trabalho enriquece o conhecimento sobre gêneros recentemente descritos, como *Alfoldia*, *Yunnanomyces* e *Halocryptovalsa*.

O experimento de crescimento dos isolados fúngicos provenientes de ambiente salino em ligninas industriais e compostos fenólicos apresentou resultados interessantes, indicando o seu potencial para aplicação biotecnológica. O uso de ligninas industriais nos experimentos realizados aproxima esses resultados de contextos reais de aplicação, ampliando sua relevância para processos industriais.

O crescimento de isolados de *Aspergillus*, como *A. neoniger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C), em catecol sugere seu potencial uso em estratégias de biorremediação. Além disso, o crescimento robusto da maioria dos isolados fúngicos em meio de cultivo suplementado com os ácidos vanílico e 4-hidroxibenzóico pode indicar sua capacidade de atuar na desconstrução de monômeros provenientes da lignina. Isso reforça o potencial desses microrganismos na desconstrução desse polímero recalcitrante e na geração de produtos de valor agregado.

A avaliação da atividade lignolítica de isolados fúngicos provenientes de ambientes salinos, pertencentes a uma coleção composta por gêneros distintos, incluindo alguns recentemente descritos e ainda pouco estudados, representa uma contribuição relevante para a literatura científica. Esses resultados podem incentivar futuros estudos mais direcionados a cada gênero. Embora apenas alguns fungos tenham demonstrado atividade lacase, o potencial biotecnológico da coleção não deve ser subestimado, uma vez que cada microrganismo apresenta um metabolismo singular. É possível que alguns isolados apresentem atividade lacase, mas que esta não tenha sido devidamente induzida nas condições experimentais utilizadas. Fatores como agitação, temperatura e composição do meio de cultivo podem influenciar significativamente a expressão dos genes associados à produção de enzimas lignolíticas. Assim, a presença desses genes em um isolado fúngico não garante sua expressão em todas as condições de cultivo. Além disso, a escassez de dados na literatura relacionando a maioria dos isolados à produção de enzimas lignolíticas representa uma limitação para a utilização de condições de ensaio direcionadas. Notavelmente, a detecção de atividade lacase em *Alfoldia vorosii* constitui uma contribuição inédita deste trabalho, uma vez que até aqui os estudos sobre esse gênero são de natureza taxonômica.

As análises dos cromatogramas de UPLC permitiram verificar que os fungos estão utilizando e modificando a lignina presente no meio. Os picos encontrados instigam buscas futuras a respeito das suas possíveis identidades. Nessa exploração, os isolados de *T. harzianum* (7M9L1%*s/s*Salina37°C) e *A. neoniger* (20MWL1%*s/s*Apicum28°C) obtiveram mais destaque: o primeiro por apresentar picos diferentes do controle, em todas amostras analisadas, e o outro por ter diminuído os picos referentes aos oligômeros de lignina de forma significativa.

Por fim, investigações quanto à produção de biomoléculas a partir de lignina pelos isolados encontrados acrescentam positivamente a literatura. A detecção da produção de alguns fitormônios, como AIA e compostos derivados, mesmo que em quantidades pequenas, amplia as possibilidades de aplicações da coleção de fungos provenientes de ambiente salino como bioinsumos agrícolas.

8 Perspectivas Futuras

Para delineamentos experimentais mais eficientes é necessário a conclusão da identificação por ITS dos isolados: 10CZL0,1%+4,5%*sApicum*28°C, 9MWL0,1%+11%*sSalina*28°C, 7MWL1%*s/sSalina*28°C e 12MWL1%*s/sApicum*28°C. Assim como, identificação complementar com outros primers, como *translation elongation factor* 1 α (EF-1 α) e RNA Polymerase II (RPB2), para uma aproximação maior da identidade dos isolados: 4CZL1%*s/sApicum*28°C, 7CZL1%*s/sApicum*28°C, 8MWL0,1%+s11%*Salina*28°C, 6MWL0,1%+s11%*Salina*28°C, 15MWL1%*s/sApicum*28°C e 11MWL1%*s/sApicum*28°C.

Na busca por atividades ligninolíticas, recomenda-se a realização de experimentos em condições de cultivo heterogêneas, considerando a literatura específica de cada gênero. Além disso, testes para a detecção de outras enzimas, como manganês peroxidase e lignina peroxidase, são igualmente relevantes. Até o momento, não há publicações que relacionem espécies do gênero *Alfoldia* à atividade de lacase; portanto, o resultado obtido com o isolado 4CZL1%*s/sApicum*28 °C (*Alfoldia vorosii*), que mais se destacou no experimento, evidencia a necessidade de investigações adicionais quanto ao potencial de outras enzimas ligninolíticas. Outro aspecto promissor envolve a avaliação da capacidade desses fungos crescerem em bio-óleos provenientes de processos industriais de extração de lignina, bem como em derivados como o licor negro, além da mensuração de sua capacidade de descoloração da lignina em cultivos líquidos.

Um planejamento com o cultivo dos isolados fúngicos restantes para análises por UPLC se faz necessário. Talvez a alteração das condições de cultivo e meio de cultura, como adição de triptofano, possam estimular melhor a desconstrução de lignina, assim como a geração de bioprodutos.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K.; NILSSON, R. H. *et al.* The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered, **Nucleic Acids Research**, p. D791–D797, v. 52, n D1, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkad1039>>.
- ABBASS, K.; QASIM, M. Z. *et al.* A review of the global climate change impacts, adaptation, and sustainable mitigation measures. **Environ Sci Pollut Res Int.**, v. 29, n. 28, p. 42539-42559, 2022.
- ABDEL-WAHAB, M. A.; ASOLKAR, R. N; INDERBITZIN, P. *et al.* Secondary metabolite chemistry of the marine-derived fungus *Massarina sp.*, strain CNT-016. **Phytochemistry**, p. 1212-1218, v. 68, n. 8, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.020>>.
- ABDEL-WAHAB M. A., DAYARATHNE M. C. *et al.* Saprobic marine fungi and a new combination. **Botanica Marina**, v. 60, 4, p. 469-488, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/bot-2016-0118>>.
- ABDESHAHIAN, P.; ASCENCIO, J. J.; PHILIPPINI, R. R.; ANTUNES, F. A. F.; INGLE, A. P.; ABDESHAHIAN, M.; SANTOS, J.C.; SILVA, S. S. Fermentative production of Lasiodiplodan by *Lasiodiplodia Theobromae* CCT3966 from pretreated sugarcane straw. **Sustainability**, 13, 9697, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/Su13179697>>.
- AGUILAR, A.; TWARDOWSKI, T. Bioeconomy in a changing word. **EFB Bioeconomy Journal**, v. 2, 100041, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioeco.2022.100041>>.
- AGUSTIN, M. B.; DE CARVALHO, D. M.; LAHTINEN, M. H.; HILDEN, K.; LUNDELL, T.; MIKKONEN, K S. Laccase as a tool in building advanced lignin-based materials. **ChemSusChem**, v. 14, n. 21, p. 4615-4635, 2021.
- AGRAWAL, S.; CHAVAN, P.; DUFOSSÉ, L. Hidden treasure: halophilic fungi as a repository of bioactive lead compounds. **J. Fungi**, v. 10, n. 4, p. 290, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof10040290>>.

AHMAD, N.; ASLAM, S.; HUSSAIN, N. *et al.* Transforming lignin biomass to value: interplay between ligninolytic enzymes and lignocellulose depolymerization.

Bioenerg. Res, p.1246–1263, 2023, v. 16. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-022-10541-y>>.

AHMED, A. M.; MAHMOUD, B. K.; MILLÁN-AGUIÑAGA, N.; ABDELMOHSEN, U. R.; FOUAD, M. A. The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products.

RSC Adv. p. 1339-1369, v. 13, n. 2, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/d2ra04126j>>.

AKBAR ALY, A. B.; SHANMUGARAJ, B.; RAMALINGAM, S. Industrial applications of *Phanerochaete chrysosporium* lignin-degrading enzymes: current status, production challenges, and future directions. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 41, 5, p. 171, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-025-04388-6>>.

ALABDALALL, A. H.; AL-ANAZI, N. A.; ALDAKHEEL, L. A.; AMER, F. H. I.; ALDAKHEEL, F. A.; ABABUTAIN, I. M.; ALGHAMDI, A. I.; AL-KHALDI, E. M. Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 10, p. 1-10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/1038/s41598-021-98927-4>>.

ALAM, B.; LǏ, J.; GĚ. Q.; KHAN, M. A.; GŌNG, J.; MEHMOOD, S.; YUÁN, Y.; GŌNG, W. Endophytic fungi: From symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa?. **Front. Plant Sci.**, v. 12, 791033, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.791033>>.

ALEKSEYEVA, K. S.; HERNDL, G. J.; BALTAR, F. Influence of salinity on the extracellular enzymatic activities of marine pelagic fungi. **J. Fungi**, p.152, v.10, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof10020152>>.

ALI, S.; RANI, A. *et al.* Recent advances in characterization and valorization of lignin and its value-added products: challenges and future perspectives. **Biomass**, v. 4, n. 3, p. 947-977, 2023.

ALSHEHRI, B.; PALANISAMY, M. Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. **Saudi J Biol Sci.** v. 27, n. 2, p. 751-756, 2019.

- AMBATKAR, N.; JADHAV, D. D.; NANDI, S.; KUMBHAR, P.; KOMMOJU, P. Optimized process for the production of fungal peroxidases and efficient saccharification of pre-treated rice straw. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, 100913, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100913>>.
- AMOOZEGAR, M. A.; SAFARPOUR, A.; NOGHABI K. A.; BAKHTIARY, T.; VENTOSA, A. Halophiles and their vast potential in biofuel production. **Front. Microbiol**, p. 1895, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01895>>.
- AMUZU, P.; PAN, X. *et al.* Recent updates on the secondary metabolites from *Fusarium* fungi and their biological activities (covering 2019 to 2024). **J. Fungi**, v. 10, n. 11, p. 778, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof10110778>>.
- ARREGUI, L.; AYALA, M.; GÓMEZ-GIL, X. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microb Cell Fact**, v. 18, 200, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>>.
- ATIWESH G.; PARRISH, C. C.; BANOUB, J.; LE, T. T. Lignin degradation by microorganisms: A review. **Biotechnol. Prog.**, e3226, v. 38, n. 2, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.3226>>.
- BAI, X.; MAIQIAN NIE, M.; DIWU, Z.; WANG, L.; NIE, H.; WANG, Y.; ZHANG, B.; YIN, Q. Preparation of 2-hydroxymuconic semialdehyde from catechol by combining enzymatic catalysis with bisulfite nucleophilic addition. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 105970, 2021.
- BALK, M.; SOFIA, P.; NEFFE, A. T.; TIRELLI, N. Lignin, the lignification process, and advanced, lignin-based materials. **Int. J. Mol. Sci.**, 11668, v. 24, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms241411668>>.
- BARBER-ZUCKER, S.; MINDEL, V.; GARCIA-RUIZ, E.; WEINSTEIN, J. J.; ALCALDE, M.; FLEISHMAN, S. J. Stable and functionally diverse versatile peroxidases designed directly from sequences. **J. Am. Chem. Soc.** v. 144, n. 8, p. 3564–3571, 2022.
- BARBOSA, M. F.; SALES, R. M. M.; GALARZA, F. A. D.; KRUGER, C. Q.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biological resources driving productivity: bioinputs for sustainable plant agriculture in Brazil. **Sustainable Microbiology**, v. 2, n. 3, qvaf011, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/sumbio/qvaf011>>.

BATISTA, B. G.; CHAVES, M. A.; REGINATTO, P.; SARAIVA, O. J.; FUENTEFRIA, A. M. Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, e20200013, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0013-2020>>.

BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiol**, p. 189, v. 10, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>>.

BHATI, C.; MINOCHA, N. *et al.* Performance liquid chromatography: recent patents and advancement. **Biomed Pharmacol J**, v. 15, n. 2, 2022.

BİLKAY, I. S.; KARAKOÇ, Ş.; AKSÖZ, N. Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. **Turkish Journal of Biology**, v. 34, n. 3, p. 313-318, 2010.

BILAL, M.; QAMAR, S. A. *et al.* Exploring the potential of ligninolytic armory for lignin valorization – A way forward for sustainable and cleaner production, **Journal of Cleaner Production**, 129420, v. 326, 2021.

BILAL, M.; ZDARTA, J. *et al.* Manganese peroxidases as robust biocatalytic tool — An overview of sources, immobilization, and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, 123531, 2023.

BOAMAH, S.; ZHANG, S.; XU, B.; LI, T.; CALDERÓN-URREA, A. *Trichoderma longibrachiatum* (TG1) enhances wheat seedlings tolerance to salt stress and resistance to *Fusarium pseudograminearum*. **Front. Plant Sci.** v. 12, p. 741231, 2021.

BOHACZ, J.; KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T., Modification of post-industrial lignin by fungal strains of the genus *Trichoderma* isolated from different composting stages, **Journal of Environmental Management**, v. 266, P. 110573, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110573>>.

BRADSHAW, M. J. *et al.* Extensive intragenomic variation in the internal transcribed spacer region of fungi. **iScience**, v. 26, n. 8, 107317, 2023.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. **Enzyme Res.**, v. 10, p. 45–65. Disponível em: <<https://doi.org/10.4061/2010/149748>>.

BRZONOVA, I.; KOZLIAK, E. I.; ANDRIANOVA, A. A. *et al.* Production of lignin based insoluble polymers (anionic hydrogels) by *C. versicolor*. **Sci Rep.**, v. 7, p. 17507, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17696-1>>.

CAO, H.; WANG, C.; LIU, H. *et al.* Enzyme activities during benzo[a]pyrene degradation by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a polluted soil. **Sci Rep.**, v. 865, n. 10, 2020.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CASTRO, H. G. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 176-185, 2017.

CHEN, A. J.; HUBKA, V. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. **Stud Mycol.** v. 88, p. 37-135, 2017.

CHEN, X.; HU, X.; LU, Q.; YANG, Y.; LINGHU, S.; ZHANG, Z. Study on the differences in sludge toxicity and microbial community structure caused by catechol, resorcinol and hydroquinone with metagenomic analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 302, p. 114027, 2022.

CHEN, Y.; PENG, Y.; DAI, C.; JU, Q. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phanerochaete liquidambari*. **Applied Soil Ecology**, v. 51, p. 102-110, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.004>>.

CHOI, Y. W.; HYDE, K. D.; WELLCOME, W. H. H. Single spore isolation of fungi. **Fungal Diversity**, v.3, 1999.

CHOUDHURI, S. Chapter 6 - Sequen. In: _____ (Org.). **Bioinformatics for Beginners**. 1ª Ed. Massachusetts: Academic Press, 2014, p. 133-155.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Front. Energy Res.** v. 2, n. 12, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012>>.

CILLINGOVÁ, A.; ZEMAN, I.; TÓTH, R.; NEBOHÁČOVÁ, M.; DUNČKOVÁ, I.; HÖLCOVÁ, M.; JAKÚBKOVÁ, M. *et al.* Eukaryotic transporters for hydroxyderivatives of benzoic acid. *Sci Rep.*, v. 7, n.1, p. 8998, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09408-6>>.

CORONA, B.; SHEN, L.; REIKE, D.; CARREÓN, J. R.; WORRELL, E. Towards sustainable development through the circular economy—A review and critical assessment on current circularity metrics, *Resources, Conservation and Recycling*, 104498, v.151, 2019, ISSN 0921-3449. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104498>>.

CROUS, P. W.; CARNEGIE, A. J.; WINGFIELD, M. J. *et al.* – Fungal planet description sheets: 868–950. **Persoonia** v. 42, p.291–473, 2019.

CROUS, P. W.; JURJEVIĆ, Ž.; BALASHOV, S. *et al.* Fungal planet description sheets: 1614–1696. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 13, p. 183–440, 2024. Disponível em: <<https://10.3114/fuse.2024.13.11>>.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. *et al.* Fungal planet description sheets: 1697–1780. **Fungal Systematics and Evolution** v. 14: p. 325- 577, 2024. Disponível em: <<https://10.3114/fuse.2024.14.19>>.

COSTA, R. V.; COTA, L. V. *et al.* Patogenicidade de *Pantoea ananatis* e *Phaeosphaeria maydis* em Plantas de Milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v. 83, 26 p., 2013. ISSN 1679-0154.

DASHORA, K.; GATTUPALLI, M.; TRIPATHI, G. D.; JAVED, Z.; SINGH, S.; TUOHY, M.; SARANGI, P. K.; DIWAN, D.; SINGH, H. B.; GUPTA, V. K. Fungal assisted valorisation of polymeric lignin: mechanism, enzymes and perspectives. **Catalysts**, p. 149, v. 13, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/catal13010149>>.

DASSARMA, S.; DASSARMA, P. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. **Curr Opin Microbiol.** v. 25, p. 120-6, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.009>>.

D'ARRIGO, P.; ROSSATO, L. A. M.; STRINI, A.; SERRA, S. From waste to value: recent insights into producing vanillin from lignin. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 442, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules29020442>>.

DEANGELIS, K. M.; GLADDEN, J. M.; ALLGAIER, M. *et al.* Strategies for enhancing the effectiveness of metagenomicbased enzyme discovery in lignocellulolytic microbial communities. **Bioenergy Research**, p.146–158, v.3, n.2, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-010-9089-z>>.

DEBNATH, S.; DAS, M.; MONDAL, S.; SARKAR, B. K.; BABU, G. Advances in chromatography: contemporary techniques and applications. **Essential Chem**, v. 2, n. 1, p. 1–27, 2025.

DE CARVALHO, M. J. A.; JESUÍNO, R. S. A. *et al.* Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, n. 3, p. 204-210, 2003.

DELGADO, G., NAU, T.; MACIÁ-VICENTE, J.G., *Halocryptovalsa endophytica* sp. nov. Fungal Planet 1514. pp. 234–235. In: Crous *et al.* Fungal Planet description sheets: 1478–1549. **Persoonia**, v. 50, p.158–310, 2023.

DESSBESELL, L.; PALEÓLOGO, M.; LEITCH, M.; PULKKI, R.; XU, C. Global lignin supply overview and kraft lignin potential as an alternative for petroleum based polymers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, 109768, 2020.

DEVADATHA, B.; CALABONUM, M. S. *et al.* Molecular data reveals a new holomorphic marine fungus, *Halobyssothecium estuariae*, and the asexual morph of *Keissleriella phragmiticola*. **Mycology**, p.167–183, v.11, n.3 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1700025>>.

DUARTE, J. C.; FERREIRA, M. C. Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 377–386, 1994. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00057.x>>.

DINH GIAP, V.; HUU NGHI, D.; HUU CUONG, L.; THU QUYNH, D. Lignin peroxidase from the white-rot fungus *Lentinus squarrosulus* MPN12 and its application in the biodegradation of synthetic dyes and lignin. **BioResources**, v. 17, n. 3, p. 4480-4498, 2022.

DINIZ, M. T. M.; VASCONCELOS, F. P.; MARTINS, M. B. Inovação tecnológica na produção brasileira de sal marinho e as alterações socioterritoriais dela decorrentes: uma análise sob a ótica da teoria do empreendedorismo de Schumpeter. **Sociedade e Natureza**, v.27, n.3, p.421-438, 2015.

EDENS, W. A. *et al.* Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3071–3074, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.65.7.3071-3074.1999>>.

EL-DEMERDASH, A. Chemical diversity and biological activities of *Phaeosphaeria* fungi genus: a systematic review. **J Fungi**, v. 4, n. 4, p. 130, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof4040130>>.

EL-GENDI, H. *et al.* A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. **J Fungi (Basel)**, v. 8, n.1, p.23, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof8010023>>.

EL-RAHMAN, M. K. A. *et al.* UPLC-PDA: A greener miniaturized tool for the analysis and purity assessment of ebastine and phenylephrine hydrochloride, *Microchemical Journal*, v. 159, 105400, 2020.

ELSAYIS A.; HASSAN, S. W. M.; GHANEM, K. M.; KHAIRY, H. Suggested sustainable medical and environmental uses of melanin pigment from halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* AS1. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022

ELSEBAIA, M. F.; EL MADDAH, F.; KEHRAUS, S.; KÖNIG, G. M. New bicyclo-spartinols from the marine-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*. **Nat. Prod. Commun**, v. 10, p. 637–639, 2015.

ELSEBAIA, M. F.; KEHRAUSA, S.; GUÜTSCHOWB, M.; KÖNIGA G.M. New polyketides from the marine-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*. **Nat. Prod. Commun**, v. 4, p.1463–1468, 2009.

ELSHAFEI, A. M.; ELSAYED, M. A.; IBRAHIM, G. E. *et al.* Production and biochemical characterization of *Pleurotus ostreatus* NRC 620 laccase and evaluation of its efficacy in apple juice clarification. **Sci Rep**, v. 15, 20143, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-025-04992-4>>.

ETALE, A.; ONYIANTA, A. J.; TURNER, S. R.; EICHHORN, S. J. Cellulose: A review of water interactions, applications in composites, and water treatment. **Chemical Reviews**, v. 123, n. 5, p. 2016-2048, 2023.

EZEONUEGBU, B. A.; ABDULLAHI, M. D. *et al.* Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Sci Rep.**, v. 12, n. 1, p. 2094, 2022.

FALADE, A. O.; NWODO, U. U.; IWERIEBOR, B. C.; GREEN, E.; MABINYA, L. V.; OKOH, A. I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, p. e00394, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mbo3.394>>.

FAROUK, N.I.; SABRY, S.M.; ELHOSAINY, A.M. *et al.* Adaptation strategies in haloalkaliphilic fungi: *Aspergillus salinarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, and *Penicillium camemberti*. **BMC Microbiol**, v. 25, n. 160, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-025-03848-1>>>

FERNANDES, R. T. V.; OLIVEIRA, J. F.; OLIVEIRA, J. C. D.; FERNANDES, R. T. V.; NASCIMENTO, L.; PINTO, A. R. M.; NOVAES, J. L. C. Impacto da carcinicultura no manguezal do rio das Conchas, Porto do Mangue, Rio Grande do Norte. **Revista Sociedade & Natureza**, v. 30, n. 3, p. 64–84, 2018. DOI: 10.14393/SN-v30n3-2018-4.

FERNANDO, L. D.; PÉREZ-LLANO, Y.; DICKWELLA WIDANAGE, M. C. *et al.* Structural adaptation of fungal cell wall in hypersaline environment. **Nat Commun**, p. 7082, v. 14, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-023-42693-6>>.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 93, p.233-269, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>>.

FRANCISCO, C. S. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Sci Rep.**, v. 9, n. 1, p. 9642, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45994-3>>.

FRANZIN M. L.; MOREIRA C. C.; DA SILVA, L. N. P.; MARTINS, E. F.; FADINI, M. A. M.; PALLINI, A.; ELLIOT, S. L.; VENZON, M. *Metarhizium* associated with coffee seedling roots: positive effects on plant growth and protection against *Leucoptera*

coffeella. **Agric. (Switzerland)**, v. 12, p. 2030, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/agriculture12122030>>.

FU, S. F.; WEI, J. Y.; CHEN, H. W.; LIU, Y. Y.; LU, H. Y.; CHOU, J. Y. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. **Plant Signal Behav.** v. 10, n. 8, e1048052, 2015.

FUSARO, R. M. Inoculation technique for fungus cultures. **Appl Microbiol.**, v. 23, n. 1, p.174-176, 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/am.23.1.174-176.1972>>.

GAUTAM, A. K.; VERMA, R. K.; AVASTHI, S.; SUSHMA; BOHRA, Y.; DEVADATHA, B.; NIRANJAN, M.; SUWANNARACH, N. Current insight into traditional and modern methods in fungal diversity estimates. **J Fungi (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 226, 2022.

GAYNES, R. The discovery of Penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. **Emerg Infect Dis.** p. 849-853, v. 23, n. 5, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid2305.16155600>>.

GHAEDI, M.; BOLBOLI, Z.; MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, R. First report of *Peroneutypa scoparia* associated with canker disease on *Ficus carica* in northern Iran. **New Disease Reports**, v. 48, e12201, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ndr2.12201>>.

GHATTAVI, K.; HOMAEI, A.; KAMRANI, E.; KIM, S. Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. **Dyes and Pigments**, v.201, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110214>>.

GHAMRAWI, S.; GASTEBOS, A.; ZYKWINSKA, A.; VANDEPUTTE. P.; MAROT, A.; MABILLEAU, G. *et al.* Multifaceted study of *Scedosporium boydii* cell wall changes during germination and identification of GPI-anchored proteins. **PLoS One**. e0128680, v. 10, n. 6, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128680>>.

GHOSH, S.; SACHAN, A. & MILTRA, A. Degradation of ferulic acid by a white rot fungus *Schizophyllum commune*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 21, p. 385–388, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-004-3621-2>>.

GILGADO, F.; CANO, J.; GENE, J.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. **J Clin**

Microbiol., v. 43, n. 10, p. 4930–42, 2005. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005>>.

GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA, A.; JASIŃSKA, A.; DŁUGOŃSKI, A.; PŁOCIŃSKI, P.; DŁUGOŃSKI, J. Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, e0231453, 2020.

GOSTINČAR, C.; ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. No need for speed: slow development of fungi in extreme environments, **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 1-14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.002>>.

GU X.; HUA, Y. H.; ZHANG, Y. D.; BAO, D.; LV, J.; HU, H. F. The pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*, host defense mechanisms, and the development of afmp4 antigen as a vaccine. **Pol J Microbiol.** p. 3-11, v. 70, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.33073/pjm-2021-003>>.

GUMUŁKA, P.; ŻANDAREK, J. UPLC technique in pharmacy—an important tool of the modern analyst. **Processes**, v. 10, n. 12, p. 2498, 2022.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; SITNIK, M.; WOJCIESZYŃSKA, D. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in cis,cis-muconic acid production. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 6, p. 1297-307. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10482-013-9910-8>>.

HMAD, I. B.; GARGOURI, A. Halophilic filamentous fungi and their enzymes: Potential biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v. 381, p. 11-18, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.12.008>>.

HILDEBRAND, E. M. Techniques for the isolation of single microorganisms. **Botanical Review**, p. 627–64, v. 4, n. 12, 1938.

HÖLKER, U.; BEND, J.; PRACHT, R.; TETSCH, L.; MÜLLER, T.; HÖFER, M.; HOOG, G. S. *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 287–294, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10482-005-0101-0>>.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SEIFERT, K. A.; OVERY, D. P.; TUTHILL, D. M.; VALDEZ, J. G.; SAMSON, R. A. New penicillin-producing *Penicillium* species and an

overview of section Chrysogena. **Persoonia**. v. 29, p. 78-100, 2012. doi: Disponível em: <<https://doi.org/10.3767/003158512X660571>>.

IRAM, A.; BERENJIAN, A.; DEMIRCI, A. A review on the utilization of lignin as a fermentation substrate to produce lignin-modifying enzymes and other valueadded products. **Molecules**, v. 26, n. 10, 2960, 2021.

IRAM, F.; ALAM, P.; SIDDIQUI, N. A.; ALQASOUMI, S. I.; SIDDIQUI, A. A.; KHAN, S. A.; HUSAIN, A. Development of a stress induced validated UPLC-PDA method for the analysis of Eslicarbazepine acetate. **Saudi Pharm J.**, v. 26, n. 2, p.286-291, 2018.

ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. **Front Plant Sci**, v. 10, p. 80, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>>.

IWANICKI N. S.; PEREIRA A. A. *et al.* Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. **Sci. Rep.** v. 9, p. 4443, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38594-8>>.

JANUSZ, G. *et al.* Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and Evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>>.

JIMÉNEZ- GOMEZ, I. J.; VALDÉS-MUÑOZ, G.; MORENO-PERLIN, T. *et al.* Haloadaptative responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation: morphology, compatible solutes, and oxidative stress at NaCl saturation. **J Fungi (Basel)**. p. 316, v. 6, n. 4, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof6040316>>.

KANAUJIA R.; SINGH S.; RUDRAMURTHY S. M. Aspergillosis: an update on clinical spectrum, diagnostic schemes, and management. **Curr Fungal Infect Rep**, p.1-12, v. 4, 2023.

KARIMZADEH, S.; S. HARTMAN, D. D.; CHIARELLI, M. C.; RULLI, P. D. The tradeoff between water savings and salinization prevention in dryland irrigation. **Adv. Water Resour.**, v. 183, 104604, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2023.104604>>.

KATATI, B.; KOVÁCS, S.; NJAPAU, H. *et al.* Maize *Aspergillus* section *Flavi* isolate diversity may be distinct from that of soil and subsequently the source of aflatoxin contamination. **Mycotoxin Res**, v. 40, p. 351–367, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12550-024-00532-7>>.

KAUR, M. J.; GULATI, S. K.; SINGH, G.; *et al.* Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: Nutraceutical and therapeutic potential. **Trends in Food Science and Technology**, v. 122, p. 187-200, 2022.

KEJŽAR, A. *et al.* Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment, **Fungal Biology**, v. 117, n. 5, p. 368-379, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.006>>.

KHAN, F. A.; IRSHAD, R.; TANVEER, N.; YAQOOB, S.; RAZAULLAH; ALI, R.; ALI, N.; SAIFULLAH, J.; ALI HASAN, K.; NAZ, S.; QADIR, A.; JABEEN, A.; WANG, Y. Unleashing the potential of vanillic acid: A new twist on nature's recipe to fight inflammation and circumvent azole-resistant fungal infections. **Bioorg Chem.**, v. 145, p. 107254, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107254>>.

KHYDE, K. D. Intertidal fungi from the mangrove fern *Acrostichum speciosum*, including *Massarina acrostichi* sp. **Mycological Research**, v.93, n.4, p. 435-438, 1989. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S09537562\(89\)80037-1](https://doi.org/10.1016/S09537562(89)80037-1)>.

KONAN, D.; NDAO, A.; KOFFI, E.; ELKOUN, S.; ROBERT, M.; RODRIGUE, D.; ADJALLÉ, K. Biodecomposition with *Phanerochaete chrysosporium*: A review. **AIMS Microbiol.**, v. 10, n. 4, p. 1068-1101, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3934/microbiol.2024046>>.

KUMAR, V. P.; SRIDHAR, M.; RAO, R. G. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11170, 2022.

KUTRAITE, I.; AUGUSTINIENE, E.; MALYS, N. Hydroxybenzoic acids: Microbial metabolism, pathway engineering and products. **Biotechnology Advances**, v. 81, p.108571, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2025.108571>>.

LACKNER, M.; DE HOOG, G.S.; YANG, L. *et al.* Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. **Fungal Diversity**, v. 67, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-014-0295-4>>

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev.**, p.310-50, v. 2, n. 2, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CMR.12.2.310>>.

LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J. Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. **Microbiol. Res**, v. 183, p. 8–18, 2016.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **J. Basic Microbiol.**, v. 41, p. 185-227, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200107\)41:3/4<185::AID-JOBM185>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200107)41:3/4<185::AID-JOBM185>3.0.CO;2-T)>.

LERICHE-GRANDCHAMP, M.; FLOURAT, A.; SHEN, H.; PICARD, F.; GIORDANA, H.; ALLAIS, F.; FAYEULLE, A. Inhibition of phenolics uptake by ligninolytic fungal cells and its potential as a tool for the production of lignin-derived aromatic building blocks. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 4, p. 362, 2020.

LESAGE-MEESSEN, L.; LOMASCOLO, A.; BONNIN, E. *et al.* A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 102, p. 141–153, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:141>>.

LEYRONAS, C.; DUFFAUD, M.; NICOT, P. C. Compared efficiency of the isolation methods for *Botrytis cinerea*. **Mycology**, v. 3, n. 4, p. 221–225, 2012. Disponível: <<https://doi.org/10.1080/21501203.2012.727484>>.

LI, G.; JIAN, T.; LIU, X. *et al.* Application of metabolomics in fungal research. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7365, 2022.

LI, G.; WANG, H.; ZHU, R.; SUN, L.; WANG, L.; LI, M.; LI, Y.; LIU, Y.; ZHAO, Z.; LOU H. Phaeosphaerins A-F, cytotoxic perylenequinones from an endolichenic fungus, *Phaeosphaeria* sp. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 142–147, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np200614h>>.

LI, H.; FU, Y.; SONG, F. Marine *Aspergillus*: A treasure trove of antimicrobial compounds. **Mar. Drugs**, p. 21, v. 277, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md21050277>>.

LI, S. F. *et al.* Degradation and transformation of lignin by a fungus *Aspergillus flavus* strain F-1. **Iran J Biotechnol.** e2461, v. 18, n. 3, 2020.

LINDSAY, C. A.; KINGHORN, A. D.; RAKOTONDRAIBE, H. L. Bioactive and unusual steroids from *Penicillium* fungi. **Fitoquímica**, 113638, v. 209, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113638>>.

LIU, K.; ZHAO, H.; REN, D. *et al.* Learning approach for species-level taxonomic classification of fungal ITS sequences. **Computers**, v. 14, n. 3, p. 85, 2025.

LUBBERS, R. J. M.; DILOKPIMOL, A.; VISSER, J.; DE VRIES, R. P. *Aspergillus niger* uses the peroxisomal CoA-dependent β -oxidative genes to degrade the hydroxycinnamic acids caffeic acid, ferulic acid, and p-coumaric acid. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.105, n. 10, p. 4199-4211, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11311-0>>.

LUBBERS, R. J. M.; DILOKPIMOL, A.; VISSER, J.; HILDÉN, K. S.; MÄKELÄ, M. R.; DE VRIES, R. P. Discovery and Functional Analysis of a Salicylic Acid Hydroxylase from *Aspergillus niger*. **Appl Environ Microbiol**, v.87, p. e02701-20, 2021.

LUBERS, R. J. M.; MARTÍNEZ-REYES, N.; RAHNAMA, N.; NAIR, R.; PRIETO, I. *et al.* Vanillin dehydrogenase (VhdA) from *Aspergillus niger* is active on depolymerized lignina. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 8, n. 100179, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.senv.2024.100179>>.

MA, Q.; LIU, L. *et al.* Biosynthesis of vanillin by different microorganisms: a review. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 38, n. 40, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03228-1>>.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In Cellulases and their Applications. Advances in Chemistry Series, (ed. R. F. Gould), p. 391-414, v. 95 1969. Washington, DC: American Chemical Society.

MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis, **Journal of Microbiological Methods**, p. 7-14, v. 71, n. 1, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>>.

MANUJA, R.; SACHDEVA, S.; JAIN, A.; JASMINE CHAUDHARY, J. A. Comprehensive Review on Biological Activities of P-Hydroxy Benzoic Acid and Its Derivatives. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 22, n. 2, p. 109-115, 2013.

MARTINEZ, Y. *et al.* Biotechnological development of Trichoderma-based formulations for biological control. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 5595–5612, v. 107, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x>>.

MARTÍNKOVÁ, L.; GRULICH, M. *et al.* Bio-Based Valorization of Lignin-Derived Phenolic Compounds: A Review. **Biomolecules**, v. 13, n. 5, p. 717, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biom13050717>>.

MATHURA, S. *et al.* Hemicelluloses from bioresidues and their applications in the food industry – towards an advanced bioeconomy and a sustainable global value chain of chemicals and materials. **Sustainable Food Technol.**, v. 2, p. 1183-1205, 2024.

MATTOO, A. J.; NONZOM, S. Endophytes in lignin valorization: a novel approach. **Front. Bioeng. Biotechnol**, 895414, v. 10, 2022.

MEHRA, R. *et al.* Uma explicação estrutural-química da atividade da lacase fúngica. **Sci Rep**, v. 8, p. 17285, 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>>.

MELLO, S. C. M. de; REIS, A.; SILVA, J. B. T. da. Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: fungos filamentosos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 335; Embrapa Hortaliças. Documentos, 134).

MENDES, I. V.; GARCIAL, M. B. *et al.* Bacterial diversity dynamics in microbial consortia selected for lignin utilization. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, e0255083, 2021.

MESQUITA E. *et al.* Utilization of Metarhizium as an insect biocontrol agent and a plant bioinoculant with special reference to Brazil. **Front. Fungal Biol.** 4:1276287, 2023. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1276287>>.

MEYER, E.; STOFFEL, S. C. G.; DE ALMEIDA, A. F. N.; DO AMARAL SCARSANELLA, J.; VIEIRA, A. S.; VENTURA, B. S.; CANEI, A. D.; BORTOLINI, J. G.; DE FARIA, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; LOVATO, P. E. *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* improve growth of herbaceous plants and soil biological

activity in revegetation of a recovering coal-mining area. *Braz J Microbiol.*, v. 55, n. 3, p. 2827-2837, 2024. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01390-2>>.

MIKKILÄ, J.; TROGEN, M.; KOIVU, K. A. Y. *et al.* Fungal Treatment Modifies Kraft Lignin for Lignin- and Cellulose-Based Carbon Fiber Precursors. **ACS Omega**, v. 5, n. 11, p. 6130-6140, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00142>>.

MILSTEIN, O. *et al.* Lignin degrading ability of selected *Aspergillus spp.* **Appl Biochem Biotechnol**, p. 393–394, v. 9, 1984.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. E. M. Untapped Potential of Marine-Associated *Cladosporium* Species: Na Overview on Secondary Metabolites, Biotechnological Relevance, and Biological Activities. **Marine Drugs**, v. 119, n. 11, p. 645, 2021.

MOLINA-MONTENEGRO, M.A. *et al.* Antarctic root endophytes improve physiological performance and yield in crops under salt stress by enhanced energy production and Na⁺ sequestration. **Sci Rep**, v.10, 5819, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62544-4>>.

MONTOYA, A. M.; GRIMALDO, J.; GONZÁLEZ, G. M. Phenotypic and molecular identification of *Fusarium spp.* clinical and environmental isolates. **Gac Med Mex.**, v. 160, n. 5, p. 554-561, 2024.

MORSY, M.; CLECKLER, B.; ARMUELLES-MILLICAN, H. Fungal endophytes promote tomato growth and enhance drought and salt tolerance. **Plants**, v. 9, p.1–18, 2020.

MOTTA, A. S.; SIMONETTI, A. B.; FRANCO, A. C.; FRAZZON, A. P. G.; BRILHANTE, C.; BENTO, F. M.; CORÇÃO, G.; VAINSTEIN, M. H.; COSTA, M.; VALENTE, P.; VAN DER SAND, S. Manual de Aulas Práticas de Microbiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

MUJTABA, M. *et al.* Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics, **Journal of Cleaner Production**, v. 402, 136815, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>>.

MULÈ, G.; SUSCA, A. *et al.* A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 495–502, 2004.

MUTHUKUMAR, G.; NICKERSON A. W.; NICKERSON, K. W. Calmodulin levels in yeasts and filamentous fungi, **FEMS Microbiology Letters**, v. 41, n. 3, p. 253–255, 1987.

MURKOVIC, M. Phenolic compounds. In: **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Burlington: Elsevier Science Ltd., 2003. p. 4507-4514.

NEWELL, S. Y.; PORTER D.; LINGLE, W. L. Lignocellulolysis by ascomycetes (fungi) of a saltmarsh grass (smooth cordgrass). **Microsc Res Tech**. v. 33, n. 1, p. 32-46, 1996.

NILSSON, R. H. *et al.* A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. **Microbes and Environments**, p. 145-150, v. 30, n. 2, 2015.

NILZA, N.; PRASAD, R.; VARMA, A.; SALAM, M. D. Deconstruction of Alkali Lignin and Lignocellulosic Substrates by *Aspergillus ochraceus* DY1 Isolated from Rotten Wood. **J Fungi (Basel)**, v. 10, n. 12, p. 810, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof10120810>>.

NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. 1984: *Hortaea*, a new genus to accommodate *Cladosporium werneckii*. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 26, n. 2, p. 139-146, 1984.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. *et al.* Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma spp.* Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, Pombal, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, M.; AZEVEDO, L. Molecular Markers: An Overview of Data Published for Fungi over the Last Ten Years. **J Fungi (Basel)**, v. 8, n. 8, p. 803, 2022.

OLIVEIRA, M. Z. A. *et al.* Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para agricultura baiana. **Bahia Agrícola**, v. 9, n.2, p. 24-29, 2013.

ORFALI, R. *et al.* Recent updates on the bioactive compounds of the marine-derived genus *Aspergillus*. **RSC Adv.**, p.17116-17150, v. 11, 2021.

PANDI, A., GOWTHAMAN, M.K.; KAMINI, N.R. Pulp bio-bleaching using a stable and scalable laccase from *Peroneutypa scoparia*. **Wood Sci Technol**, v. 55, p. 1509–1525, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00226-021-01312-7>>.

PANDI, A. *et al.* A sustainable approach for degradation of leather dyes by a new fungal laccase, **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 590-597, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.048>>.

PAPADOPOULOU, C. I.; LOIZOU, E.; CHATZITHEODORIDIS, F. Priorities in Bioeconomy Strategies: A Systematic Literature Review. **Energies**, p.7258, v. 15, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/en15197258>>.

PAROT, M.; RODRIGUES, D.; STEVANOVIC, T. High purity softwood lignin obtained by an eco-friendly organosolv process. **Bioresource Technology Reports**, v. 100880, n.17, 2022.

PATANKAR, R. S.; ZAMBARE, V. P.; PONRAJ, M. Physiological aspects of the halophilic and halotolerant fungi, and their potential applications. **Novel Research in Microbiology Journal**, p.1371-1391, v. 5, n. 5, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.21608/nrmj.2021.199315>>.

PELÁEZ, R. D. R. *et al.* Production of enzymatic extract with high cellulolytic and oxidative activities by co-Culture of *Trichoderma reesei* and *Panus lecomtei*. **Fermentation**. v. 8, p. 522, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/fermentation8100522>>.

PEREZ, D. G.; MATELJAK, I. *et al.* Alkaline versatile peroxidase by directed evolution. **Catal. Sci. Technol.**, v. 6, p. 6625-6636, 2016.

PESSÔA, M. G. *et al.* Fusarium species-a promising tool box for industrial biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**. p. 3493-3511, v. 101, n.9, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8255-z>>.

PHUKHAMSAKDA, C. *et al.* The numbers of fungi: contributions from traditional taxonomic studies and challenges of metabarcoding. **Fungal Diversity**, p. 327–386, v. 114, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-022-00502-3>>.

PIETIKÄINEN, J.; PETTERSSON, M.; BÅÅTH, E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 1, p. 49–58, 2005.

PÓCSI, I.; DIJKSTERHUIS, J.; HOUBRAKEN, J. *et al.* Biotechnological potential of salt tolerant and xerophilic species of *Aspergillus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 108, n. 521, 2024.

POIRIER, W.; BOUCHARA, J. P.; GIRAUD, S. Lignin-Modifying Enzymes in *Scedosporium* Species. **J. Fungi**, p. 105, v. 9, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof9010105>>.

PUPART, H.; VASTŠJONOK, D. *et al.* Dye-Decolorizing Peroxidase of *Streptomyces coelicolor* (ScDyPB) Exists as a Dynamic Mixture of Kinetically Different Oligomers. **ACS Omega**, v. 9, n. 3, p. 3866–3876, 2024.

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

RAJA, HUZEFAA.; MILLER, ANDREW N.; PEARCE, CEDRIC J.; OBERLIES, N. H. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, 2017. Disponível: <<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>>.

REJANI, C. T.; RADHAKRISHNAN, S. Microbial conversion of vanillin from ferulic acid extracted from raw coir pith. **Nat Prod Res.**, v. 36, n. 4, p. 901–908, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1849194>>

RYAZANOVA, T. V.; CHUPROVA, N. A.; LUNEVA, T. A. Effect of *Trichoderma* fungi on lignin from tree species barks. **Catal. Ind.**, v. 7, p. 82–89, 2015. Disponível: <<https://doi.org/10.1134/S2070050415010134>>.

RIZK, S. M.; MAGDY, M. An indigenous inland genotype of the black yeast *Hortaea werneckii* inhabiting the great pyramid of Giza, Egypt. **Front Microbiol.**, v. 26, n. 13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997495>>.

RODIONOVA, M. V. *et al.* A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production. **International Journal of Hydrogen**

Energy, p. 1481-1498, v. 47, n. 3, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.122>>.

RODRÍGUEZ, L. A. Y. *et al.* Exploring extremophilic fungi in soil mycobiome for sustainable agriculture amid global change. **Nat Commun**, v. 15, p. 6951, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-024-51223-x>>.

ROUSSEAUX, S. *et al.* Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins, **Food Microbiology**, v. 38, p. 104-121, 2014.

ROVAI, A. S. *et al.* Brazilian Mangroves: Blue Carbon Hotspots of National and Global Relevance to Natural Climate Solutions. **Front. For. Glob. Change**, v. 4, 2022, Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.787533>>.

SAHU, N. *et al.* Hallmarks of Basidiomycete Soft- and White-Rot in Wood-Decay Omics Data of Two Armillaria Species. **Microorganisms**, v.9, n 149, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** p. 406-25, v.4, n.4, 1984. Disponível em: <[doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454)>.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. – **Stud. Mycol.**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SÁNCHEZ-ROMERO, M. Á. *et al.* Systematic Review of Tinea Nigra: A Clinical Approach. **J. Fungi**, v. 11, p. 287, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof11040287>>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 59S-76S, v. 74, n. 12, 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/00006250-199004001-00013>>.

SANTOS, M. C. F. V. Apicuns, salgados e manguezais e a ideologização do debate sobre a carcinicultura marinha brasileira. **Revista da ABCC**, v.7, n.4, p.1-8, 2005.

SATHIYABAMA, M. *et al.* Micodegradação de polietileno de baixa densidade por *Cladosporium sphaerospermum*, isolado de platisfera. **Sci Rep**, v. 14, p. 8351, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-024-59032-4>>.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHIN, S. K. *et al.* Estudos de valorização avançada de lignina com base em vários tipos de enzimas lignolíticas e micróbios. **Tecnologia de Biorrecursos**, v. 289, 121728, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121728>>.

SHOREY, R.; SALAGHI, A.; FATEHI, P.; MEKONNEN, T. H. Valorization of lignin for advanced material applications: a review. **RSC Sustainability**, v. 2, n. 4, p. 804-831, 2024.

SILVA, D.; RODRIGUES, C. F. *et al.* Biocatalysis for biorefineries: The case of dye-decolorizing peroxidases, **Biotechnology Advances**, v. 65, 108153, 2023.

SIMÃO, R. C. G.; GOMES, S. L. Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. **J. Bacteriol**, v. 183, p. 2280–2288, 2001.

SINGH A. K.; BILAL, M. *et al.* Lignin peroxidase in focus for catalytic elimination of contaminants - A critical review on recent progress and perspectives. **Int J Biol Macromol**, v. 177, p. 58-82, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.032>>.

SINGH, G.; ARYA, S. K. Utility of laccase in pulp and paper industry: A progressive step towards the green technology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 1070-1084, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.168>>.

SINGH, S.; KHAJURIA, R. Chapter 11 – *Penicillium* Enzymes for the Textile Industry. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier**, p. 201-215, 2018. ISBN 9780444635013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00011-9>>.

SINGH, S. B. *et al.* Isolation, Structure, and Biological Activity of Phaeofungin, a cyclic lipodepsipeptide from a *Phaeosphaeria* sp. using the genome-wide *Candida albicans* fitness test. **J. Nat. Prod.**, v. 76, p. 334–345, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/np300704s>>.

SIQUEIRA, A. C. O. *et al.* Multi-Trait Biochemical Features of *Metarhizium* Species and Their Activities That Stimulate the Growth of Tomato Plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 137, 2020. Disponível em: <<https://https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00137>>

SLIZEWSKA, W.; SWITA, K. S.; MIKOŁAJCZYK, O. M, Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi—Current Perspective. **Int. J. Mol. Sci.** p. 4189, v. 23, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms23084189>>.

STUKENBROCK, E. H. *et al.* *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the *Septoria tritici* leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*), **Mycologia**, v. 104, n. 6, p. 1397-1407, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.3852/11-374>>.

SU, H.; HAO, T. *et al.* Complex evolutionary patterns within the tubulin gene family of ciliates, unicellular eukaryotes with diverse microtubular structures. **BMC Biol.**, v. 22, n. 1, v. 170, 2024.

SUGANO, Y.; NAKANO, R.; SASAKI, K.; SHODA, M. Efficient Heterologous Expression in *Aspergillus oryzae* of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. **Appl Environ Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1754-1758, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1754-1758.2000>>.

SUHAS, V. K.; GUPTA, V. K. *et al.* Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent, **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066-1076, 2016.

SUSCA, A.; VILLANI, A. *et al.* Identification of toxigenic fungal species associated with maize ear rot: Calmodulin as single informative gene. **International Journal of Food Microbiology**, v. 319, 108491, 2020.

SZALEWSKI, D. A. *et al.* A patogenicidade de *Aspergillus fumigatus*, resistência a medicamentos e entrega de nanopartículas. **Jornal Canadense de Microbiologia**. p. 439-453, v. 64, n.7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/cjm-20170749>>.

TAIRA, J., TOYOSHIMA, R., AMEKU, N. *et al.* Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. **AMB Expr**, v. 8, p. 40, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0569-4>>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, **Molecular Biology and Evolution**, p. 3022–3027, v. 38, n. 7, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>>.

TANG, P. L.; HASSAN, O. Bioconversion of ferulic acid attained from pineapple peels and pineapple crown leaves into vanillic acid and vanillin by *Aspergillus niger* I-1472. **BMC Chem.**, v. 14, n. 1, p. 7, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13065-020-0663-y>>.

TAROLLI, P. *et al.* Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering, **iScience**, v. 27, n. 2, p. 108830, 2024. Disponível <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108830>>.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. **Nova Hedwigia**, v. 109, n.1–2, p. 187–224, 2019. Disponível <https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528>.

TIBPROMMA, S. *et al.* Fungal diversity notes 840–928: micro-fungi associated with Pandanaceae. **Fungal Diversity** v. 93, p. 1–160, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-018-0408-6>>.

TIŠMA, M.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P.; ŠELO, G.; TOLJ, I.; ŠPERANDA, M.; BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIĆ, M. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities, **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124997, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>>.

TOGHUEO, R. M. K.; BOYOM, F. F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **Biotech.**, v. 10, n. 3, p. 107, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>>.

UZMA, F.; MOHAN, C. D.; HASHEM, A.; KONAPPA, N. M.; RANGAPPA, S.; KAMATH, P.V.; SINGH, B. P.; MUDILI, V.; GUPTA, V. K.; SIDDAIAH, C. N.; CHOWDAPPA, S.; ALQARAWI, A. A.; ABD-ALLAH, E. F. Endophytic Fungi—Alternative Sources of Cytotoxic Compounds: A Review. **Front. Pharmacol**, v. 9, p. 309, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00309>>.

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and Conservation of Microorganisms. **Journal of Culture Collections**, p. 17-28, v. 4, 2005.

VARELA, M. F.; STEPHEN, J.; BHARTI, D.; LEKSHMI, M.; KUMAR, S. Inhibition of Multidrug Efflux Pumps Belonging to the Major Facilitator Superfamily in Bacterial Pathogens. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, p. 1448, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines11051448>>.

VELASQUEZ, R. *et al.* An emerging *Platynota* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) infesting blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in the central coast of Peru. **Front. Insect Sci.** 5:1593907, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/finsc.2025.1593907>>.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies In Mycology**, v. 78, p. 343–371, 2014.

VIRMANI, S. *et al.* Degradação de lignina por *Acinetobacter baumannii* S2, *Aspergillus niger* SF4 e *Rhodotorula glutinis* lignolíticos isolados e caracterização de produtos sob a perspectiva da biovalorização. **Waste Biomass Valor**, v. 15, p. 101–114, 2024.

WANG, G.; MENG, X.; WANG, P.; WANG, X.; LIU, G.; WANG, D. A.; FAN, C. A catechol bioadhesive for rapid hemostasis and healing of traumatic internal organs and major arteries. **Biomaterials**, v. 291, p. 121908. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121908>>.

WANG, J.; SHIRVANI, H. *et al.* Lignocellulosic biomass valorization via biophoto/electro hybrid catalytic systems, **Biotechnology Advances**, v. 66, p. 108157, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108157>>.

WANG, W.; FENG, H.; SUN, C. *et al.* Thiocladosporides F-J, antibacterial sulfur containing 12-membered macrolides from the mangrove endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* HDN13-314. **Phytochemistry**, v. 178, p. 112462, 2020.

WENG, C.; PENG, X.; HAN, Y. Despolimerização e conversão de lignina em bioprodutos de valor agregado por catálise microbiana e enzimática. **Biotechnol Biocombustíveis**, p. 84, v. 14, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>>.

WINGFIELD, L. K.; JITPRASITPORN, N.; CHE-ALEE, N. Isolation and characterization of halophilic and halotolerant fungi from man-made solar salterns in Pattani Province, Thailand. **PLoS ONE**, e0281623, v. 18, n.2, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281623>>.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis. **Academic Press**, Inc., New York, p. 315-322, 1990.

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122848, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>>.

WOLFENDEN, B. S.; WILSONS, R. L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of Chem. Soc. Perkin Trans**, p. 805-812, 1982.

WOO, S. L.; HERMOSA, R.; LORITO, M.; MONTE, E. *Trichoderma*: a multipurpose, plantbeneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nat Rev Microbiol**, p. 312– 326, v. 21, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>>.

XIE, X. G.; DAI, C. C. Degradation of a model pollutant ferulic acid by the endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 35-42, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.112>>.

XIE, X.; TIAN, Q.; LIU J, ZHANG, X.; YE, X.; ZHANG, X. Further exploitation of metabolic potential for catechol biodegradation of *Klebsiella sp.* CD33. **Chemosphere**, v, 368, 143737, 2024.

XIAO, J. Z.; KUMAZAWA, S.; TOMITA, H.; YOSHIKAWA, N.; KIMURA, C.; MIKAWA, T. Rousselianone A. novel antibiotic related to phenalenone produced by *phaeosphaeria rousseliana*. **J. Antibiot.**, v. 46, p. 1570–1574, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1570>>.

XU, K.; HUO, Y.; TANG, S.; HAN, S.; LIN, Y.; ZHENG, S. A novel laccase for alkaline medium temperature environments in the textile industry. **Biotechnology Journal**, v. 19, e2400383, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/biot.202400383>>.

XU, L.; FAKHRA LIAQAT, F.; SOL, J.; KHAZI, M. I.; XIE, R.; ZHU, D. Advances in the vanillin synthesis and biotransformation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 189, p. 113905, 2024.

YANG, N.; ZHANG, W.; WANG D.; CAO, D.; CAO, Y.; HE, W.; LIN, Z.; CHEN, X.; YE, G.; CHEN, Z.; CHEN, J.; WEI, X. A novel endophytic fungus strain of *Cladosporium*: its identification, genomic analysis, and effects on plant growth. **Front. Microbiol**, v. 14, v. 1287582, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1287582>>.

YANG, X.; HAMEED, U.; ZHANG, A. F. *et al.* Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. **Sci Rep** 7, 40954, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep40954>>.

YAO, L.; YANG, H.; MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Toward a fundamental understanding of the role of lignin in the biorefinery process. **Front. Energy Res**. 804086, v. 9, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.80408>>.

YAO, X.; GUO, H.; ZHANG, K.; ZHAO, M.; RUAN, J.; CHEN, J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. **Front. Microbiol**. 14:1160551, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1160551>>.

YIN, G.; ZHANG, Y.; PENNERMAN, K. K.; WU, G.; HUA, S. S. T.; YU, J.; JURICK, W. M.; GUO, A.; BENNETT, J. W. Characterization of blue mold *Penicillium* species isolated from stored fruits using multiple highly conserved Loci. **J. Fungi**, v. 3, n. 1, p. 12, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof3010012>>.

YOU, F.; HAN, T. *et al.* Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 162-165, 2009.

YOUNAS, H.; YOUNAS, F. Produção de fitohormônios por fungos endofíticos. In: ABD-ELSALAM, K. A.; ABUQAMAR, S. F. (Org.) **Fungal Endophytes**, v. I., Singapura: Springer, 2025. p. 385–413.

YOVCHEVSKA, L.; GOCHEVA, Y. *et al.* Halophilic Fungi—Features and Potential Applications. **Microorganisms**, v. 20, n. 13, p. 175, 2025.

YU X. D.; ZHANG, S. N.; LIU J. K. Morpho-phylogenetic evidence reveals novel pleosporalean taxa from Sichuan province China. **J Fungi**, v. 8 n. 7, p. 720, 2022 Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jof8070720>>.

ZAINITH, S.; PANKAJ CHOWDHARY, P.; SUJATA MANI, S.; MISHRA, S. Microbial ligninolytic enzymes and their role in bioremediation. **Microorganisms for**

Sustainable Environment and Health, v. 9, p. 179-203, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12819001-2.00009-7>>.

ZHAI, S.; WANG, K.; YU, F.; GAO Z.; YANG, X.; CAO, X.; SHAGHALEH H.; HAMOUD Y. L. Effects of *Trichoderma harzianum* combined with *Phanerochaete chrysosporium* on lignin degradation and humification during chicken manure and rice husk composting. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1515931>>.

ZHANG, S. N.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. *et al.* Current insights into palm fungi with emphasis on taxonomy and phylogeny. **Fungal Diversity**, v. 127, p. 55–301, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13225-024-00536-9>>.

ZHANG, W.; DIAO, C.; WANG, L. Degradation of lignin in different lignocellulosic biomass by steam explosion combined with microbial consortium treatment. **Biotechnol Biofuels**, p.16, v.55, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-023-02306-2>>.

ZHANG, Z. Y.; PAN, H.; TAO, G. *et al.* Culturable mycobiota from Guizhou Wildlife park in China. **Mycosphere**, v. 15, n. 1, p. 654–763, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.5943/mycosphere/15/1/5>>.

ZHAO, Z.; LIU, H. *et al.* Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. **Sci Rep**, v. 4, p. 6746, 2014.

ZHAO, L.; ZHANG, J. *et al.* Biological degradation of lignin: A critical review on progress and perspectives. **Industrial Crops and Products**, v. 188, part B, 115715, 2022.

ANEXOS

ANEXO 1 - M9, CZAPEK, Meio Mandels & Weber (MANDELS, M.; WEBER, 1969) e Elementos Traços (DEANGELIS *et al.*, 2010)

Meios M9 1 L

200 mL de solução de sais M9 5x

2 mL de MgSO_4 1M

100 μL de CaCl_2 1M

6 mL de elementos traços 170X

22 g de ágar

Autoclavar o meio e adicionar elementos traços 170X estéril.

CZAPEK 1L

NaNO_2 2,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g

K_2HPO_4 1,0 g

Ágar 20,0 g

KCl 0,5 g

10 mL da solução 100x de sulfato ferroso (FeSO_4)

Autoclavar o meio e adicionar 10 mL da solução de sulfato ferroso 100 X estéril.

MANDELS & WEBER 1 L

KH_2PO_4 2,0 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,30 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5,00 mg

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,56 mg

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,40 mg

CoCl_2 2,00 mg

CaCl_2 0,40 g

Completar o volume com água destilada e autoclavar o meio

Elementos Traço 1 L

C ₆ H ₉ NO ₆	15,0 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	30,0 g
MnSO ₄ • H ₂ O	5,0 g
NaCl	10,0 g
FeCl ₂	0,7 g
CoSO ₄	1,0 g
CaCl ₂	1,0 g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	1,0 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,1 g
ALK(SO ₄) ₂ • 12H ₂ O	0,1 g

Ajustar pH para 6,4, completar com água ultrapura e filtrar com membrana de 0,22 µL dentro do fluxo laminar.

Anexo 2 - Tampão de extração de DNA fúngico 0,1 L

Tris-HCl 1M pH 8,0	20,0 mL
NaCl 5M	5,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	5,0 mL
SDS 10%	10,0 mL
H ₂ O ultrapura	60,0 mL

Usar todos os componentes estéreis.

Anexo 3 - Tampão Mcllvaine pH 5 a 50 mM de ácido cítrico e 100 mM de fosfato de hidrogênio dissódico 0,1 L

Fosfato de hidrogênio dissódico 1,462 g

Ácido cítrico 1,019 g

Diluir em 100 ml de água ultrapura estéril, ajustar o pH para 5 com HCl ou NaOH e autoclavar.

Anexo 4 - Solução estoque de 2,6 dimetoxifenol (DMP) 0,1 L

2,6 DMP0,3854 g

Diluir em 100 mL em água ultrapura estéril.

Anexo 5 – PCR β tubulina e Calmodulina



AMPLIFICAÇÃO DO GENE (parcial) β -TUBULINA DE FUNGOS FILAMENTOSOS (Tamanho do amplicon aproximadamente 350 pb)

Componentes	Concentração estoque (depende da marca)	Concentração na reação final (literatura)	Quantidade para 1 reação de 50 μ L (a)	Quantidade para X reações (Mix) (c)	Condições de amplificação (d)
H ₂ O MilliQ esterilizada	-	-	28,9 μ L		Desnaturação inicial: 94°C ou 95°C por 4 min
Green or Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	5X	1X	10 μ L		
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	3,7 mM	7,4 μ L		
dNTPs	25 mM	0,2 mM	0,4 μ L		30 a 35 Ciclos: 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min
Primer Bt2a	10 μ M	0,2 μ M	1,0 μ L		
Primer Bt2b	10 μ M	0,2 μ M	1,0 μ L		
GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/ μ L	1,5 U	0,3 μ L		Extensão final: 72°C por 10 minutos
DNA genômico	-	-	1 a 20 ng (1,0 a 5,0 μ L) ^(b)		
TOTAL	-	-	50 μ L	Distribuir 49 μ L do mix	
				em microtubos de PCR e adicionar 1 μ L da solução de DNA.	

(a) Quantidades calculadas seguindo ($C_1V_1=C_2V_2$).

(b) Observação: Geralmente deve-se utilizar DNA genômico diluído. Quanto colocar na reação? Colocar no mínimo 1 μ L e no máximo 5 μ L em uma reação de 50 μ L. Qual a concentração do DNA genômico? Diluir o seu DNA genômico entre 1 e 20 ng/ μ L. Checar a concentração em nanodrop ou em eletroforese com marcador de DNA do bacteriófago Lambda de concentração conhecida. Não há mágica para amplificar. O que deve ser feito é utilizar DNA genômico de boa qualidade (sem inibidores) e bastante diluído.]

(c) Ou seja, não coloque DNA genômico no tubo do MIX !! O DNA deve ser colocado diretamente no microtubo de PCR previamente identificado com o nome do seu fungo.

(d) Não alterar estas condições de amplificação.

Fazer sempre apenas 1 reação de 50 μ L por fungo. Checar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%, para tanto, aplicar 5 μ L de cada amostra no gel, acrescida do Loading Buffer. Utilizar marcador de peso molecular compatível com o tamanho do seu amplicon. Se houver amplificação (banda única de tamanho esperado), refazer a amplificação daquele fungo em duplicata ou triplicata. Juntar os volumes e purificar com kit de purificação apropriado.

Referência do Primer Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61: 1323–1330.

Referência do Primer Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl Environ Microbiol 61: 1323–1330.

AMPLIFICAÇÃO DO GENE (parcial) CALMODULINA DE *Aspergillus*
(Tamanho do amplicon aproximadamente 570 pb)

Componentes	Concentração estoque (depende da marca)	Concentração na reação final (literatura)	Quantidade para 1 reação de 50 µL ^(a)	Quantidade para X reações (Mix) ^(c)	Condições de amplificação ^(d)
H ₂ O MiliQ esterilizada	-	-	28,9 µL		Desnaturação inicial: 94°C ou 95°C por 4 min 30 a 35 Ciclos: 94°C por 1 min, Gradiente 50°C a 62°C por 1 min e 72°C por 1 min Extensão final: 72°C por 10 minutos
Green or Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega)	5X	1X	10 µL		
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	3,7 mM	7,4 µL		
dNTPs	25 mM	0,2 mM	0,4 µL		
Primer cmd5	10 µM	0,2 µM	1,0 µL		
Primer cmd6	10 µM	0,2 µM	1,0 µL		
GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)	5 U/µL	1,5 U	0,3 µL		Extensão final: 72°C por 10 minutos
DNA genômico	-	-	1 a 20 ng (1,0 a 5,0 µL) ^(b)		
TOTAL	-	-	50 µL	Distribuir 49 µL do mix em microtubos de PCR e adicionar 1 µL da solução de DNA.	

(a) Quantidades calculadas seguindo ($C_1V_1=C_2V_2$).

(b) Observação: Geralmente deve-se utilizar DNA genômico diluído. Quanto colocar na reação? Colocar no mínimo 1 µL e no máximo 5 µL em uma reação de 50 µL. Qual a concentração do DNA genômico? Diluir o seu DNA genômico entre 1 e 20 ng/µL. Checar a concentração em nanodrop ou em eletroforese com marcador de DNA do bacteriófago Lambda de concentração conhecida. Não há mágica para amplificar. O que deve ser feito é utilizar DNA genômico de boa qualidade (sem inibidores) e bastante diluído.

(c) Ou seja, não coloque DNA genômico no tubo do MIX II O DNA deve ser colocado diretamente no microtubo de PCR previamente identificado com o nome do seu fungo.

(d) Não alterar estas condições de amplificação.

Fazer sempre apenas 1 reação de 50 µL por fungo. Checar a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1%, para tanto, aplicar 5 µL de cada amostra no gel, acrescida do Loading Buffer. Utilizar marcador de peso molecular compatível com o tamanho do seu amplicon. Se houver amplificação (banda única de tamanho esperado), refazer a amplificação daquele fungo em duplicata ou triplicata. Juntar os volumes e purificar com kit de purificação apropriado.

Referência do Primer cmd5 (5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3').

S-B Hong, S-J Go, H-D Shin, JC Erisvad, RA Samson. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia, 97 (2005), pp. 1316–1329.

Referência do Primer cmd6 (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3').

S-B Hong, S-J Go, H-D Shin, JC Erisvad, RA Samson. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia, 97 (2005), pp. 1316–1329.

Anexo 6 – Contigs de ITS

> 1MWL1% s/sApicum28°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACC
AGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC

CAAACGTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCG
CGGGTTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCCCTCGTGGGCGTTTTCGAA
AATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGC
CCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTC
CTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACAGCC
GTAAACACCCCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCC
GCTGAACTTAAGCATATCAATAACGGAGGAA

> 2MWL1%/s/sApicum28°C

CGGAGGATGAGCGCAGGCGGGGAGGGCGGATTGCCCTGGGACGTAGCTAC
CATGCCGAGTTACCCTGTCGAGTTGCCAGATGTCCTGCCCTGTAGCCTGCC
CGCCGGCGGGCCAACCTAAGCTCTGTTTTATTGTGGCCTTCTGAGGATTATTGT
AAATGAATTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCCATCGATGAAG
AACGCACAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCTCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCATTAATATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTACCATCAAGCCCTATTTGCTTGGCTTGGGAGACTTGGCCCCGGCCTG
CAGCTCCTGAATAGATCGGCGGAGTCGGCGACCCTCACGTAAATTCTCCGCT
TTAGTGTGCGGCGCTGGCGTTTACCGAAACCCCTATTTTTTAGTCTTGACCTCG
GGATCGGGAA

> 3MWL1%/s/sSalina28°C

TCTTGGTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG
TTTTCCGAACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCGGGGGG
CTTCCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACACCTGTGAACGCTGTCTG
AAGTTGCAGTCTGAGAACTAGCTAAATTAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTA
TTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTT
GTGTGTTGGGCCCCCGCCCCCGCGCTGGGGGGGCGGGCCCCGAAAGGC
AGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGC
TCTTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCCCTCAATCTATTTTTTCAGG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGAA

> 4MWL1%/s/sSalina28°C

TCTTGGTCANTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCCA
CCCGTGTTTSTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCAAGGCCGCC
GGGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCT
GAACGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAA
CAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
CTAGTGTGAATTGCAGAATTCGTTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGC
GCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCAT
CAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCCCCCCTCCGGGGGGGGGACG

GGCCCTAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGC
TTTGTACACCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAAACAAC
CATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCGCTGAACTTAAG
CATATCAATACGGAGA

> 5MWL1%/s/sSalina28°C

TCTTGGTCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT
GCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCAC
CCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCAAGGCCGCCG
GGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTG
AACGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAAC
AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC
TAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATC
AAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCCCCTCCGGGGGGGGGACGG
GCCCTAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCTAGCGTATGGGGCTTTGT
CACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTC
TTTCCAGGTTGACCTCGGATCARGTANGGATACCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGAA

> 6MWL1%/s/sSalina28°C

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTGTAACAACGGTTTCCGTGGTGAACCT
GCGGAAGGATCATTACCGAGCGGGCCCTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGT
GTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCGCGCCCGCCGACGGCCC
CCCTGAACGCTGTCTGAAGNTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG
CACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC
TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCCCGCCGGGGGGG
GACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATG
GGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCCA
ACCTTTAATTATCTCAGTTGACCTCGATCAGTAGGGATACCGCTGAACTTAAC
ATATCAATAAGAGA

> 8MWL1%/s/sApicum28°C

CTGCCAAGGCACACAGGGGATAGGAGGATAGGCTTTTGGCCCAACCTCCCA
CCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGC
CGCCGGGGGGGCGACTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAAC
ATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTT
AAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCATTGAATCATCGAGTCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCG
GGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCG
TATGGGGCTTCTTCTTTCCGCTCC

> 9MWL1%/s/sSalina28°C

TTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGG
GATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGGGATGTTTATAACCTTTGTT

GTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCG
GGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAAT
AAATTAACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCG
TCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGT
GCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTAT
TCGCTAAAGGGTGCTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAAACCCATTTCTAAGG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG
G

> 10MWL1%/sApicum28°C

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAC
AGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGAACCTTACCTATGTTCTGTTGCCTCGG
CGGCGTGGTCAGCGCCCCCTCTGAAAAGAGGACGATGCCCTCCCGCCGGC
AGCACCAAACCTTTTGAATTTTACAGCGGATTACAGTTCTGATTTGAAAACAAA
AAACAAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAACCTCCGTTTCCTCAGGGAAGCTCAGGGTCTG
GTGTTGGGGCGCTACGGCGAGTCTTCGCGACCCTCCGTAGGCCCTGAAATA
CAGTGGCGGTCCCGCCGCGGTTGCCTTCTGCGTAGTAAGTCTCTTTTGCAA
GCTCGCATTGGGTCCCGGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCACTATAACTCCA
GATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
T

> 11MWL1%/sApicum28°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACC
AGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCCTCG
CGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGC
CCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAG
CCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCA
CAGCCGTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAANCGGANGAA

> 13MWL1%/sApicum28°C

TCTTGGTCBBBTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAAC
CAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTA
CCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATNTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCG
GACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTC
GCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGA
AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA

ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGG
CCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCA
GCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCC
ACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGAA

> 14MWL1%/s/sApicum28°C

TTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCCAACCTCCCATAA
GTGTNTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGNTTGTTCGGCCGCCG
GGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACAC
GAACACTGTCTGAAAGCGTGCACTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAA
CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC
TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGG
GACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATG
GGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCA
ACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATACGGAGNAAA

> 15MWL1%/s/sApicum28°C

TCTTGGTCTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT
GCGGAAGGATCATTACCGTTGGGGGTCAAACCTCCAATCGGGATAGACACCCT
TGCCTTTGAGTACCTTTTCGTTTCCTCGGCGGGCTCGCCCGCCGGTGGACAT
CCAAAAAACCCTTGTAAATAGCAGTATCTTCTGAATAAAAAGCAAATAGTCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCTTCGGTATTCCGTTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTG
AAAATTCAAGCTCAGCTTGGTGTGTTGGGTGCTTGTCCCCCCCCCTTCCGCGGC
GGGACTCACCTCAAATGCATTGGCGGCCGGCATGTTGGCTTCGAGCGCAGT
AGAAACGCGCCCGGCGTCTGGACGTGCCCGGTCTTCCACGAAGCCCACTTC
TAACGCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGGCGGGAGGAA

> 17MWL1%/s/sApicum28°C

AGTATATACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTG
GTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCAACCTCCAACCCCTGTGA
ATCATACCTTTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGGACCCA
AACCTTCTGAATTTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAATGAATCAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTAC
GCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGTGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTT
TCCAGCACAGCCGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTC
TGCGCAGTAGTAAAGCACTCGCAACAGGAGCCCGGCGCGGTCCACTGCCGT
AAAACCCCCCAACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGACTGAGA

> 18MWL1%/s/sApicum28°C

TCTTGGTCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACC
AGCGGAGGGATCATTAAATGAGTTTTCTAAACTCCAAACCCTTGAGAACATACC
TAGTTGCCTCGGCGGACTTGCCCTGGGACGACCTACCCTGCAGCGAGTTAC
CCTGTAACGAGTTGCCCTGTAGAGACCTGCCCTGTAGCCTGCCCCGCCGGCG
GCCAACCTAAACTCTGTTTTATTGTGGCACTTCTGAGGATTATTCTAAATGAAT
TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATT
TCAACCATCAAGCCCTATTTGCTTGCGGTTGGGAGACTTGTAGGCCCGGCCT
GCAAGCTCCTGAAATAGATCGGCGGAGTCGTGGCGACCCTCAGCGTAGTAAT
TCTTCTCGCTTTAGGTGTCGGCGCTGGCGTTTAGCCGTTAAACCCCTATTTT
TTTTAGTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGACTGAGACTGCCAAGGCACACAGGATAGGA

> 19MWL1%/s/sApicum28°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCG
TGA CTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCC
GGGGGGCGACTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAA
CCCTGTTCTGAAAGCTTGCAKTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAC
TTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT
GCCCTCAAGCCCGGCTTGTTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGG
GACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATG
GGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGACGCATTT
GTTTGCAACTTGTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC
TGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

> 20MWL1%/s/sApicum28°C

TCTTGGTTT TAGAGGAAGTAAAAGTCTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
GGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGT
CTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGG
GGCGCCTTTGCCCCCGGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACA
CTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTT
AACAAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
TCAAGCCCGGCTTGTTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGGGACGG
GCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCT
TTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTTCCAACCAT
TTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAAGGAA

> 24MWL1%/s/sApicum28°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACC
AGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATCCA ACTCCCAACCCCTGTGAATCATACC

TTTAATTGTTGCGCGGGACTTCGCGCCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAAT
TTTTTAATAAGTATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAATGAATCAAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC
CGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACGCCCCCTCAAGT
CCCCTGTGGACTTGGTGTGTTGGGGATCGGCGAGGCTGGTTTTCCAGCACAGC
CGTCCCTTAAATTAATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGT
AAAGCACTCGCAACAGGAGCCCCGGCGCGGTCCACTGCCGTAAAACCCCCCA
ACTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAA

> 29MWL1%/sApicum28°C

TCTTGGTCTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCA
GCGGAGGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTT
ATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCCGCGCCCGGTAAAACGGGAMGGCCCCGC
CAGAGGACCCAACTCTATTGTATTTTAGTGTATCTTCTGAGTAACACAAAACA
AATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCCGGGTTTGGTGTGTTGGGGATCGGCGAG
TGTTCCCTTCTGGGACCAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCA
GCCTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAACGCGGCGCGGCCA
AGCCGTAAACCCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC
CGCTGAACTTAAGCATATCATAAA

> 1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C

AGACAGTATATACTTGGTCATTTAGAGGTTGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCG
TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGCGC
CCAACCTCCCACCCGTGAATACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCTCCC
TCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCA
GTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCG
GGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGT
GTTGGGTCTGTCGTCCCCCCCCGGGGGAMGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGC
ACCGTGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTATCACCCGCTCGACTAGGG
CCGGCCGGGCGCCAGCCGACGTCTCAACCATTTTTCTTCAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

> 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTTCGAGCTCCGGCTCGACTCTCCCACCCT
TTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCA
AACTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAATT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCC
TCAAGCTCTGCTTGGAATTGGGCACCGTCTCACTGCGGACGCGCCTCAA
GACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTT

TGGAGCGGTTGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGG
TTGACCTCGGATCAGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAACGGA
GGAA

> 6MWL0,1%+s11%Salina28°C

GAAGTCTCATCTCCCCCTGTCTCGCCCCCGAGACTATGAGCAGGCGCCCTG
GCCGAACCCTTGATTTTCTGTGTACCTTGTTTCCTCGGCGAGCTCGCTCGTC
GCTAGGACTCATCAACAACCTTTTTTAAATACTCAATCAGCGTCTGAACAAAAC
TTAATATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCTGA
GCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGCGTTGGGTGTTTATCCTAGCCTT
TGCGCCCCGGATTCACCTCAAAGAAATTGGCAGCCGGCATATTGGTTCTGAAG
CGCAGCACATTTTTCGGGCTTTAACTGGTATAAGTTGGCGTCCATGAAGCTATA
TTTTTCACGCTTGACCTCGGATCAGGTAAGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGACTGAGACTGCCAAGGCACACAGGGGATAGGA

> 8MWL0,1%+s11%Salina28°C

TCCCAAGGTAACCAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGG
GATCATTACAGAGTTATCTAACTCCCAAACCATGTGAACTTACCTATGTTGCC
TCGGCAGGGGGCTGACCCTAGGCATGCTTACCCTGGAGTGAGCTACCCTGG
AGTCCAGCAGCATCTCCTGCCGGCGGACCTCCAACTCTTGTTTATACGTGG
GCAATTCTGAGAATTATACATAATACGTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATAGTATTCTA
GTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCTAATTGCTTGG
TGTTGGGAGCTTATCTCGCCATAGCTGATAACTCCTGAAAGTCMTCGTCGGT
GTCGTGACGACCCCTAAGTGTAGTAATTTGTTCTCGCTTCTGGTGTGTTGTCTG
CTGGCATCCGGCCGCTAAATCTCTTATTTTTTCTAGTGGTTGACCTCGGATCA
GGTAGGAATACCCCTTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA

> 1M9L1%/sSalina37°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCC
GTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCC
GGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGA
ACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
CTCAAGCACGGCTTGTTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACG
GGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGC
TTTGTACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTAT
TTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAAT

> 4M9L1%_{s4},5%Apicum37°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCAC

CCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCAAGGCCGCCG
GGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTG
AACGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAAC
AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC
TAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCG
CCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATC
AAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCTCCCCCCTCCGGGGGGGGACGG
GCCCTAAAGGCAGCGGCGSCCCCGC

> 7M9L1%/s/sSalina37°C

TCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCA
GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTAC
CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGATTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA
CCAAGGCGCCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGC
GGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCARAATTGAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCANATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCNAN
CGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCNTTGGGNAACGNCC
TCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATANNNTGGCGGTCTCGCCGCANCC
TCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACA
GCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGAA

> *1M9L1%/s/sApicum28°C

CTGCCAAGGCACACAGGGGATAGGAGGATAGGCTTTTGGCCCAACCTCCCA
CCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCAGCGTTGCTGGC
CGCCGGGGGGGCGACTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAAC
ATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTT
AAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCATTGAATCATCGAGTCTTTGAA
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCG
GGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCG
TATGGGGCTTCTTCTTTCCGCTCC

> 4CZL1%/s/sApicum28°C

TTCTTGGTCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTATCGTAGGGCCTCTGGCCCTGTCGAGATAGCGTCCTT
GCCTATTTTTTTGGAGCACCTCCGTTTCTCAGCAGGTCCGCCTGCTACCG
GGGACACACGAAACTCTTTGCAATCAGCAACCGTCTGAAGCAACTACAAAAA
ATCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG
CAAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCATCAAGCGCGGCTTGTGTTGGGCGCCTGTCCCGCCTCCGGCGC
GGACTCGCCTCGAATCGATTGGCGGCCCTCCCGGCGGCTCGGAGCGCAG
CAGAATTGCGACTCTACCCGCGGGGACGGCGGCACCCAGAAGCCTTTCTT
CATAATCGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AACGGAGGAA

> 7CZL1%*s/s*Apicum28°C

CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGCGAGATATATATTTTT
GGGCTTTTGTCCGAAGAATCTCCCGTCCTCATGTCATTTTGTGAAGTGGTTGC
TTTCGGCGGAGGCGTTGGCCCTTTTTTTGGGTTGACCGCCGTCGGTGGTTTT
TATTCTCTGAATATATTTGAAGATGGATTTTCAGTAAGATGGAATTAGTACAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCA
CATTGCGCCTCCTGGCATTCCGGGAGGCACGCCTGTTTCGAGCGCCATTTTCG
ACCTCCAAGCTTTGCTTGATGTTGGACCGTGTTTGTGCAACTGGTCTGAAA
CGTGTCCGGCGTCCGACGACGACCCGCGAACGTAGCAAGAACAAAGGAATCT
ATTTTCGTTTGCGCCGTGTCCGTCTTTTCGGTTCTGCCTACTTATGTTGTTTGGT
ATGGTTGGCCTCGGATCAGGTGGGGATACCCGCTGAA

> *1CZL1%*s/s*Apicum28°C

AGTATATACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTG
GTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGCC
CAGGGGATAGGATTCTGTTGCCTCGGCGGCGTGTTCTGCTCTGAAAAGAGG
ACGATGCCCTCCCGCCGGCAGCACCAAACCTTTGAATTTTACAGCGGATTA
CAGTTCTGATTTGAAAACAAAAACAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGGCAGTAAT
CTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCTCCGTTTCC
TCAGGGAAGCTCAGGGTCCGGTGTGGGGCGCTACGGCGAGTCTTCGCGAC
CCTCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCGGTTGCCTTCTGC
GTAGTAAGTCTCTTTTGAAGCTCGCATTGGGTCCCGGCGGAGGCCTGCCG
TCAAACCACCTATAACTCCAGATGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCC
GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG

> 2MWL0,1%+11%*s*Salina28°C

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT
GCGGAAGGATCATTACCGTTGGGGGTCAAACCTCCAATCGGGATAGACACCCT
TGCCTTTGAGTACCTTTTCGTTTCCTCGGCGGGCTCGCCCGCCGGTGGACA
GCCAAAAAAACCCCTTGTAATAGCAGTATCTTCTGAATAAAAAGCAAATAGTCA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCTTCGGTATTCCGTTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT
GAAAATTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGTGCTTGTCCCCCCCCCTTCCGCG
GCGGGACTCACCTCAAATGCATTGGCGGCCGGCATGTTGGCTTCGAGCGCA
GTAGAAACGCGCCCGGCGTCTGGACGTGCCCGGTCTTCCACGAAGCCCACT
TCTAACGCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGA

Anexo 7 – Contigs de β -tubulina

> 4MWL1%*s/s*Salina28°C

TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGCCTCGATGCCCCCGAGTCAA
TATGCTTTGGACGTAGGGCCTCAGCAGAAACATGAGCTCGGATATATCATTCT
CGTGTCTGACACGTGTTTGCTAATACCTTTGCAGGCAGACCATCTCCGGGGA

GCACGGCCTCGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCCGTGTACACCTCGAA
CGAACGACGACCAGATGGCATTGGAAGAGTTTCGGATGGGTCTGACAGGAA
GGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTAC
TTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTTCAGCCGCTATAAAAACGCTTTGCAA
GTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGT
CCTCGTCGATCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTT
CGGTCAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGG
TAACAACCTGGSCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTAA

> 5MWL1%*s/s*Salina28°C

TTCCGTCTCCACTTCTTCATGGTCGGCTTCGCTCCCTGACCAGCCGTGGCGC
CCACTCTTTCCGTGCCGTCTCCGTTCTGAGTTGACCCAGCAGATGTTTCGAC
CCTAAGAACATGATGGCTGCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGTACCTCACCT
GCTCTGCCATCTTGACGTGGCCATATTTTTATTTGTTCTTCCCTCTTTTGTCT
AAAACCTGACCCTTGTTTTTTAGCCGCGGAAAGGTCTCCATGAAGGAGGTTGA
GGACCAGATGCGCAACATCCAGAGCAAGAACCAGACCTACTTCGTTGAGTG
GATCCCCAACACATCCAGACCGCCCTGTGCTCCATTCTCCCCGTGGTCTC
AAGATGTCCTCCACCTTCATCGGAACTCCACCTCCATCCAGGAGCTCTTTCA
AGCGTGTCGGCGACCAGATCAGTGCTATGTTCCGTGCGCAGGCTTTCTTGCAT
TGGTACACTGGTGAAGGTAAGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCTGAGTCA
ACATGAACAATCTCGTCAA

> 10MWL1%*s/s*Apicum28°C

AAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTGCGTACATTATTCCCGACGACGCGCGATCG
AGAAACGGATGCGAGAATATAATTCTTCTGTTTCGAGATATTTCTATTTGATGGAT
AGAGTACTTATCGTATTTTTAGGCAAACCATTTCTGGCGAGCACGGTCTTGATA
GCAACGGAGTGACGGAACCCCTCATCCCTCCCCCCCCAAATGCCAGTCAC
ATCGACTGGTGCTGCTCTCACTTTCACGGCAGACACTGATTGTCCCTTATACG
TCAAAGTTACAATGGCACTTCTGAACTTCAGCTTGAGCGCATGAGCGTTTACT
TCAACGAGGTAAGTTTTTGGTTCAAACCACGGGCTGGTTGGTGTGGTGTGCAT
CCAGCCTCCGTTGCGGAAAATACTAACGTATTGGTTACCTCCACATTATAGGC
TTCGGGCAACAAATATGTTCTCGCGCTGTCCTTGTAGATCTCGAGCCCGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGCCAACCTTTTCCGTCCCGAC
AACTTCGTCTTTGGCCAGTCCGGTGCCGGCMACAACCTGGSCCAAGGGTCAC
TAAACT

> 19MWL1%*s/s*Apicum28°C

TCGGTGCTGCTTTCTGGTACGTCTGGAATCAACCTGGGGAATGCTGGCTCTC
GTGGGATGCAGAGTCCTACGGACATGCGTCCTCGGGCTAAAAAGGGTTCCG
TGGTGGCATGATGCTGACAACCTGTACAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACG
GCCTTGATGGCTCCGGTGTGTAAGTGTCACCGACGCCCGCTCAATGGGCTC
CCATAATGGAGAATTACACGACGATGGACGATTCTGATGGAAAACAGCTTCAA
TGGCTCCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTA
CGTTCCCTTCTACACCATCCTGTGATAGATTCTCCACGCCTCCAAAGACCTC
GACACTAATTTCCGACCCCTTTAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTTCTCGT
GCCGTCTCGTTGACCTTGAGCCCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGT
CCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCTGGTG
CCGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACT

> 20MWL1%*s/s*Apicum28°C

CTGCTTTCTGGTACGTATTCACCTGCCACTGGATTGGGGATGGAACATCATCTC
TCAAGCTATCTTAGCTTGAGTTCAGATGTTATCCATCGGGTATATAGCTATCGG
GTAAAGAACACGTCTAACAACCTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGG
CCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTTCACACCTCTCAATTGGTCA
ACAATGTGGAAAGGATTGGGTTTCCTGACGCGCAGGATAGTTACAATGGCAC
CTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTAGATCA
CACCGTCCCTGAGTTTTTTTACGACAATATCATCAATGTCCTGACCACTTCAG
CAGGCTAGCGGTAAACAAGTATGTCCCCCGTGCCGTCCTCGTCGATCTCGAGC
CCGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGTCCCTTCGGCCAGCTCTTCCGTC
CCGACACTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCC

>14MWL1%/s/sApicum28°C

CGGCTTCGCTCCTCTGACCAGCCGCGGGCGCCTACTCCTTCCGTGCCGTAC
CGTTCCCGAGTTGACCCAGCAGATGTTTCGACCCCAAGAACATGATGGCTGCC
TCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTGTGAGTTT
TTCTTCCTGCATTGATTGCATTGCGCCAGCTAACAAGTATTTAGCCGTGGACG
TGTCTCCATGAAGGAGGTTGAGGACCAGATGCGCAACATCCAGAGCAAGAA
CCAGACCTACTTCGTGAGTGGATCCCCAACAACATCCAGACCGCCCTGTGC
TCCATTCTCCCGTGTTCTCAAGATGTCCTCTACCTTCATCGGTAACCTCCAC
CTCCATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTGTCGGTGATCAGTTCAC

> 1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C

TTTCCCCGTCCTCACTTCTTCATGGTCGGCTTTGCTCCTCTGACCAGCCGTG
GCGCCTACTCCTTCCGCGCCGTCTCCGTTCTGAATTGACCCAGCAGATGTT
CGACCCCAAGAACATGATGGCTGCTTCTGACTTCCGTAACGGCCGTACCTC
ACCTGCTCCGCTATCTTGTATGTGTGCCTGAATATGTTATTTGTGACTTTGGCT
AATTTATTTTCAGCCGTGGACGCGTCTCCATGAAGGAGGTTGAGGACCAGAT
GCGCAACATCCAGAGCAAGAACCAGTCCACTTCGTTGAGTGGATCCCCAAC
AACATCCAGACCGCTCTCTGCTCCATTCCCCCCCCGTGGCCTCAAGATGTCCT
CCACCTTCATTGGAACTCCACCTCCATCCAGGAACCTTCAAGCGTGTCGG
TGATCAGTTCACTGCTATGTTCCGTGCGAAGGCTTTCTTGCACTGGTACACTG
GTGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCAGTGGCTGAGTTCAACATGAACGA
ATCCTCGTCA

> 1M9L1%/s/sSalina37°C

GTGCTGCTTTCTGGTATGTCTTGACCTCAAAGCTTGGATGACGGGTGATTGG
GATCTCTCATCTTAGCAGGCTACCTCCATGGGTTGAGCCTCACTGTCATGGGT
ATCAGCTAACAATCTACAGGCAGACCATCTCTGGTGAGCATGGCCTTGACG
GCTCTGGCCAGTAAGTTCGACCTATATCCTCCCAATTGAGAAAGCGGCGGAA
ACACGGAAAACAAGGAAGAAGCGGACGCGTGTCTGATGGGAAATAATAGCTA
CAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTATTTCAACGAG
GTGTGTGGATGAACTCTTGATTTATACTATTTTCGGCAACATCTCACGATCTGA
CTCGCTACTAGGCCAACGGTGACAAATATGTTCCCTCGTGCCGTTCTGGTCGA
TCTCGAGCCTGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCGAGCT
ATTCCGTCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGG
GCCAAGG

> 4M9L1%+4,5%Apicum37°C

TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGCCTCGATGCCCCCGAGTCAA
TATGCTTTGGACGTAGGGCCTCAGCAGAAACATGAGCTCGGATATATCATTCT

CGTGTCTGACACGTGTTTGCTAATACCTTTGCAGGCAGACCATCTCCGGGGA
GCACGGCCTCGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCCGTGTACACCTCGAA
CGAACGACGACCAGATGGCATTGGAAGAGTTTCGGATGGGTCTGACAGGAA
GGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTAC
TTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCCGCTATAAAAACGCTTTGCAA
GTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTWTGTCCCTCGTGCCGT
CCTCGTCGATCTTGAGCCCGGYACCACGTCCCCTCCGTGCCGGTCCCTTCG
GTCAGCTGTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAA
CAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTAA

> 4CZL1%/s/sApicum28°C

TTTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATGGTTGGCTTCGCTCCTCTTACCAGCCGTG
GCGCCCACTCCTTCCGCGCAGTCTCCGTTCCCTGAGCTCACTCAGCAGATGTT
CGACCCTAAGAACATGATGGCTGCCTCTGACTTCCGCAATGGCCGCTACCTG
ACCTGCTCTGCCATCTTCCGTGGCAAGGTCTCCATGAAGGAGGTTCGAGGATC
AGATGCGCAATGTCCAGAACAAGAACTCTTCCTACTTTGTTGAGTGGATCCCC
AACAACTCCAGACCGCCCTCTGCTCTATTCCCCCACGTGGCCTCAAGATGT
CCTCCACCTTCGTTCGGCAATTCAACCTCCATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTGT
CGGTGACCAGTTCAGTCCATGTTTCAGGCGCAAGGCTTTCTTGCATTGGTAC
ACTGGCGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCAGTGGCCGAGTTCAACATG
AACGATCTCGTCA

> *1CZL1%/s/sApicum28°C

TCCCACTTCTTCATGGTCGGCTTTGCCCGCTTACTAGCCGTGGTGCTCACT
CTTTCCGTGCTGTCACCGTGCCCGAGTTGACCCAGCAGATGTTTCGATCCCAA
GAACATGATGGCCGCCTCCGACTTCCGCAACGGCCGATACCTCACCTGCTCT
GCCATCTTGTAAGTTTTATTCTACCCCAAACCTACGCTCTCTGTTCGAGAGTTT
CTCTCTCCTTGTGAGGAATCTCTGCTAACAAGGAGTTTTCTCTCTTTCACAGC
CGTGTAAGCTTGCCATGAAGGAGGTTCGAGGACCAGATGCGCAACGTCCAG
AGCAAGAACTCGTCGTAATTCGTTCGAGTGGATCCCCAACAACGTTTCAGACCG
CTCTTTGCTCTATTCTCCCGTGGCCTTAAGATGTCGTCGACCTTCCTGGGT
AACTCGACGGCGATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTATCGGCGAGCAGTTCACT
CTCATGTTCCGTTCGCAAGGCTTTCTTGCATTGGTACACTGGCGAGGGCATGG
ACGAGATGGAGTTCAGTGGCCGAGTTCAACATGAACGATCTCGTCA

> 1MWL1%/s/sApicum28°C

TTTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTTGCGCCTCTTACCAGCCCT
GGCGCACACTCTTTCCGCGCTGTTTCCGTTCCCTGAGTTGACCCAGCAGATGC
TGGATCCTAAGAACATGATGGCTGCCTCTGATTTCCGCAATGGCCGCTACCT
GACCTGCTCCACCATCTTCCGTGGAAAGGTTGCCATGAAGGAGGTTGAGGA
CCAGATGCGCAGCATCCAGAACAAGAACTCCACCTACTTCGTTGAGTGGATT
CCCAACAACATTTCAGACCGCCCTCTGCTCTATCCCCCCCCAAGGGCCTTAAGA
TCTCCTCCACCTTTGTTCGGTAACTCTACCGCCATCCAGGAGATTTCCGCGCT
GTTGGTGAGCAATTCAGTCCATGTTCCGACGCAAGGCTTTCTTGCATTGGT
ACACTAGCGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCAGTGGCTGAGTTCAACAT
GAACGATCTCGTCA

> 6MWL1%/s/sSalina28°C

AGCATACTGACCAATTCTTAGCAAACCATGCTGTAAGGGCGGCTTGATGGC
GATGGACAGTTGTTCTTTTCGACAAATTTGTTTACGTTTTTTTCGAGAATGGTTT

TCTGATATTTTTGGGCARCTACCGAACCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGCATG
AACGTCTACTTCACCCACGTAAGTGATACTGACCCCAATGCCATTGGAATCTT
ATCTAACCACTTTGTTTGTATCAATAGGCTTCAGTGACGTATGTTCCCCGT
GCCGTCTGGTCSACTTGACCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCTGGTCC
CTTCGGCAAGCTTTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCCGGTCAATCCGGTGCT
GGTAACAACCTGGSCCAAGGGTCACTAACTGAGGGTAA

> 2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C

TTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATGGTCGGGCTTCTCTCCTCTGACCAGCC
GTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTACCGTTCCCGAGCTCACCCAGCAGA
TGTTGACCCCAAGAACATGATGGCTGCTTCGGACTTCCGCAACGGCCGCTA
CCTTACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCCATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAAGAACTCCTCCTACTTCGTTGAGTGGA
TCCCCAACAAACGTCCAGACCGCTCTCTGCTCCATTCCCTCCCCGTGGTCTCAA
GATGTCTTCGACCTTCGTGCGCAACTCGACCTCGATCCAGGAGCTCTTCAAG
CGTGTCCGTGACCAGTTCACTGCTATGTTCCGTGCGCAAGGCTTTCTTGCAAT
GGTACACTGGTGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCTGAGTTCA
ACATGAACGATCTCGTCA

> 17MWL1% s/sApicum28°C

GGAACATGGCAGTGAACCTGCTCACCAACACGCTTGAAAAGCTCCTGGATGG
AGGTGGAGTTACCAATAGAAGTACAAGACATCTTGAGGCCACGGGGGGGGAT
GGCGCAAAGGGCGGTCTGGATATTGTTGGGGATCCATTGACGAAGTACGA
GGAGTTCTTGTTCTGCACGTTACGCATCTGGTCCTCAACCTCCTTCATAGCAA
CCTTGCCACGGCTGGAACGGAAATTAATACAATGACCTCGTATAATATGCACAT
CATTGACGATACTTACCAGATGGCAGAGCAGGTCAGGTAGCGGCCGTTTCGG
AAGTCAAAAGCGGCCATCATGTTCTTAGGGTTCGAACATCTGCTGGGTGAGCT
CAGGTACGCTGACAGCGCGGAAAGAGTGAGCACCACGGCTGGTCAGGGGG
GCGAAGCCGACCATGAAGAAGTGGAGA

> 6MWL0,1%+s11%Salina28°C

CGTCTCCACTTCTTCATGGTCGGATTTGCTCCCCTCACCCAGCCGTGGCGCGC
ACTCTTTCCGTGCTGTCACTGTTCCCGAGCTCACTCAGCAAATGTTGACCCC
CAAGAACATGATGGCTGCCTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGC
TCCGCGTACTTCCGCGGTAAGGTGCGCATGAAGGAGGTTGAGGACCAGATG
CGCAACGTCCAAAACAAGAACTCGTCTTACTTCGTTGAGTGATCCCCAACAA
ACGTCCAGACCGCTCTCTGCTCGTTCCCTCCCGTGGGCTCAAGATGTCCGCC
ACTCGTCGGTAATCCTCCTCCATCCAGAACTCTCCAAG

> 11MWL1% s/sApicum28°C

TTCATGGGGGGGCTTTGCGCCCCTTACCAGAGCCCGGGGGGGGCAATTCTTTC
CGGGTGTTTTCCGTTCCCGAGGTGACCCAGCAGATGCTGGATTCCCAAGAA
ACATGATGGCTGCCTCTGACTTCCGCAATGGCCGTTACCTGACCTGCTCCAC
CATCTTCCGTGGAAGGTTGCCATGAAGGAGGTCGAGGACCAGATGCGCAG
CATCCAGAACAAAGAACTCCACCTACTTCGTGAGTGAGTTCCCAACAACATC
CAAACCGCCCTCTGGGCTCTATCCCCCCCCAAGGGTCTCAAGATCTCCTCCAC
CTTTGTGCGCAACTCTACTGCTATCCAGGAAATTTCCGCCGTGTTGGCGAG
CAGTTCAGTGCCATGTTCCGCCGCAAGGCCTTCTTGCAATTGGTACACTAGCG

AGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCTGAGTTCAACATGAACGATCT
CGTCAGAGGGTATGGACGAGATGGAGTTCACCGAGGCCGAGTTCCAACATG
AACGATCTCGTCA

> 7CZL1%*s/s*Apicum28°C

TTTTCCCCCGTGCTCCACTTCTTCATGGTTGGATTGCTCCCCTCACTAGCCG
TGGCGCTCACTCTTTCCGTGCTGTTACCGTTCCAGAACTGACCCAGCAGATG
TTCGACCCCAAGAACATGATGGCGGCCTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTAC
CTGACCTGCTCTGCCATCTTGTAAGTTCTATGACACGAAGCTTGATCTACAGA
CTGCTAACTTTATAACAGCCGCGGCAAGGTCTCCATGAAGGAGGTGAGGAC
CAGATGCGCAACGTCCAGAACAAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCC
CCAACAACGTCCAGACTGCTCTGCTCCATCCCACCACGCGGCCTCAAGAT
GTCGTCGACCTTCATTGGCAACTCGACCTCGATCCAGGAGCTCTTCAAGCGT
GTCGGCGATCAATCACTGCTATGTTCCGTCGCAAGGCTTTCTTGCAATTGGTA
CACTGGTGAGGGCATGGACGAGATGGAGTTCACTGAGGCCGAGTTCAACAT
GAACGAATCTCGTCA

Anexo 8 – Contigs de calmodulina

> 4MWL1%*s/s*Salina28°C

TCCGAGTACAAGGAGGCCTTCTCCCTATTCGTAAGTCATTATCATCGTTGCGG
AAAATCGGTTTTGATTAGCTTTTATTTCGAACACAAGCTGACTTGGCTTTTCTTG
GGTTCCCAATAGGACAAGGATGGTGATGGTTAGTACAAGTCATTTTATTCAATC
TCTCTTCAACTTCGACCAATATCCTTTAGCCGCCATAATTTTACCCAATTTCTGT
TCGATCGGTTATAGTCTTGGCGTTGATAAATTGACATGAGATGCAGGCCAGAT
CACCACCAAGGAGTTGGGCACTGTCATGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCCTC
TGAGTCGGAACCTCCAGGACATGATTAACGAGGTTGACGCCGATAACAATGGC
ACCATTGACTTCCCTGGTACGAGACGGCTTCCGTACGATACACACATGAAATA
GTTGTTAATGTTCAATCAGAGTTCCTTACGATGATGGCGAGAAAGATGAAGGA
TACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTCAAGGTTTTCGACCGCGA
TAACAACGGCTTTATCTCTGCTGCCGAACCTGCGCCACGTTATGACCTCTATCG
GA

> 14MWL1%*s/s*Apicum28°C

TCCGAGGGAGGCCTTCTCCCTCTTTGTGAGTGCTCCCTGAATGAACCTCCGT
TCACTCAAATCGATGACCTATCTTTCCCGGCTCATAATGCTAATGTATTTTCGA
ACTCAATAGGACAAGGATGGCGATGGTGGGTGGAATTCTGTCCCCTTCGCGT
TTTACCTGTASCGCCCGATCCGACCGCGGGATTTGACAGCTATTTCCCCATT
CGATCTGAATCATAATACTGATGTAATCTGGAAATAGGCCAGATCACCACCAAG
GAGCTCGGCACTGTGATGCGCTCCCTCGGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAG
CTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAACGATCGACT
TCCCCGGTATGTGATAGATCTACGCCTGTAAGGCGGGAATGCCGTATGGGTT
GTGATTGACTTTTGCCGCCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGTAAGATGAAG
GACACCGACTCCGAGGAGGAAATTCGCGAGGCTTTCAAGGTCTTCGACCGC
GACAACAATGGTTTCATCTCCGCCGCGGAGTTGCGCCACGTTATGACCTCTA
TCGGA

> 20MWL1%*s/s*Apicum28°C

TCCGAGTACCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTTTGTGAGTGCTCCCTGAATGAAC
CTCCGTTCACTCAAATCGATGACCTATCTTTCCCGGCTCATAATGCTAATGTAT
TTTCGAACTCAATAGGACAAGGATGGCGATGGTGGGTGGAATTCTGTCCCCT
TCGCGTTTTACCTGTAGCGCCCGATCCGACCGCGGGATTTCGACAGCTATTT
CCCCATTCGATCTGAATCATAATACTGATGTAATCTGGAAATAGGCCAGATCAC
CACCAAGGAGCTCGGCACTGTGATGCGCTCCCTCGGCCAGAACCCCTCCGA
GTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAAC
GATCGACTTCCCCGGTATGTGATAGATCTACGCCTGTAAGGCGGGGAATGCCG
TATGGGTTGTGATTGACTTTTGCCGCCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGTA
AGATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGAAATTCGCGAGGCTTTCAAGGTCT
TCGACCGCGACAACAATGGTTTCATCTCCGCCGCGGAGTTGCGCCACGTTAT
GCCTATCGGA

> 1MWL0,1%+4,5%Apicum28°C

CCTTCTCCCTATTTGTAAGTGCCATTGATTCCATCGGTATCAATTGGATGGCTT
TTCCGGGAGGGTACTAATCTATTCTGCACTTAACAGGACAAGGATGGCGATG
GTTAGTGTGCTCCCCGCGATAACTTGGTCGCATACGCCCAATGTCGACACCA
TAATTCTATGTAATTGGATATTGACACACGATCCAGGCCAGATCACTACCAAGG
AGCTCGGCACCGTGATGCGCTCGCTCGGCCAGAACCCCTCAGAGTCTGAGC
TTCAGGACATGATCAACGAAGTCGACGCTGACAACAACGGCACCATTGATTT
CCCAGGTACGTGCCTTTGCAAAAATAAGATCACCGTGAAATCGGACAACCTGTT
GACTGTTAAATAGAGTTCCTCACGATGATGGCTAGAAAGATGAAGGACACCGA
CTCCGAGGAGGAAATTCGGGAGGCATTCAAGGTTTTCGACCGTGATAACAAT
GGCTTCATCTCGGCTGCCGAGCTGCGCCACGTTATGACCTCTA

> 1M9L1%*s/s*Salina37°C

TCCGAGTACAAGGAGGCCTTCTCTCTCTTCGTAAGTGAAGTGTCCAAGTCCC
TGGTCGTTGTATAGGAGGGATCTCCAGAATATTGAGGGTGTGCGCTGACACG
AGATTTGACGTATAGGACAAGGATGGTGATGGTTAGTGACCCTTTTTTCCACTC
CTCGAACTTCGGCTTCCATGCGATCATGTTCAAACGCCGACTCACAATATCCG
GAAATGACCCTTCAGTACTGATAATATCTATGTTTGACTATCAGGCCAGATCAC
CACCAAGGAATTGGGCACTGTAATGCGCTCTCTGGGCCAGAACCCCTTCCGA
GTCAGAGCTGCAAGATATGATCAACGAGGTGGATGCTGACAACAACGGCACC
ATCGATTTCCCCGGTATGTGATACTTTCGGTATGAACTCGGGAGGGGAGAGA
ACAMTCATTAACCTTGTAATCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGGAAGATGAA
GGACACCGACTCCGAAGAGGAAATTCGGGCAGCTTTCAAGGTCTTCGACCG
CGACAACAACGGTTTCATCTCCGCTGCGGAGCTGCGCCACGTTATGACCTCT
ATCGGA

> 4M9L1%*s*4,5%Apicum37°C

TCCGAGTACCAAGGAGGCCTTCTCCCTATTCGTAAGTCATTATCATCGTTTCGC
GAAAATCGGTTTTGATTAGCTTTTATTTCGAACACAAGCTGACTTGGCTTTTTCT
GGGTTCCCAATAGGACAAGGATGGTGATGGTTAGTACAAGTCATTTTATTCAAT
CTCTCTTCAACTTCGACCAATATCCTTTAGCCGCCATAATTTTACCCAATTTCT
GTTTCGATCGGTTATAGTCTTGGCGTTGATAAATTGACATGATATGCAGGCCAG
ATCACCACCAAGGAGTTGGGCACTGTCATGCGCTCTCTGGGCCAAAACCCC
TCTGAGTCGGAAGTCCAGGACATGATTAACGAGGTTGACGCCGATAACAATG
GCACCATTGACTTCCCTGGTACGAGACGGCTTCCGTACGATACACACATGAA
ATAGTTGTTAATGTTCAATCAGAGTTCCTTACGATGATGGCGAGAAAGATGAA
GGATACCGACTCTGAGGAGGAGATCCGGGAGGCTTTCAAGGTTTTTCGACCG

CGATAACAACGGCTTTATCTCTGCTGCCGAAGTGCGCCACGTTATGACCTCTA
TCGGA

Anexo 9 - Lista de isolados de fungos filamentosos

	Isolado	BRM	Identificação	Isolamento
1	1MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71764	<i>Trichoderma deliquescens</i>	hyphal tip
2	2MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71765	<i>Peroneutypa rubiformis</i>	hyphal tip
3	3MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71766	<i>Penicillium copticola</i>	single spore
4	4MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71767	<i>Aspergillus pseudonomiae</i>	single spore
5	5MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71768	<i>Aspergillus pseudonominae</i>	single spore
6	6MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71769	<i>Penicillium citrinum</i>	single spore
7	7MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71770	Não identificado	hyphal tip
8	8MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71771	<i>Aspergillus hortae</i>	single spore
9	9MWL1% <i>s/s</i> Salina28°C	71772	<i>Cladosporium oxysporum</i>	hyphal tip
10	10MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71773	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	hyphal tip
11	11MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71774	<i>Trichoderma sp.</i>	hyphal tip
12	12MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71775	Não identificado	hyphal tip
13	13MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71776	<i>Trichoderma harzianum</i>	hyphal tip
14	14MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71777	<i>Aspergillus neoniger</i>	single spore
15	15MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71778	<i>Massarina sp.</i>	hyphal tip
16	17MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71798	<i>Metarhizium robertsii</i>	hyphal tip
17	18MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71799	<i>Peroneutypa rubiformis</i>	hyphal tip
18	19MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71800	<i>Aspergillus hortae</i>	single spore
19	20MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71801	<i>Aspergillus neoniger</i>	single spore
20	24MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71802	<i>Metarhizium robertsii</i>	hyphal tip
21	29MWL1% <i>s/s</i> Apicum28°C	71803	<i>Fusarium caeruleum</i>	hyphal tip
22	1MWL0,1%+4,5% <i>s</i> Salina28°C	71963	<i>Aspergillus sydowii</i>	single spore
23	2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	71971	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	hyphal tip
24	2MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	71972	<i>Hortaea werneckii</i>	hyphal tip
25	6MWL0,1%+s11%Salina28°C	72088	<i>Phaeosphaeria sp.</i>	hyphal tip
26	8MWL0,1%+s11%Salina28°C	71976	<i>Halocryptovalsa sp.</i>	hyphal tip
27	9MWL0,1%+11% <i>s</i> Salina28°C	71975	<i>Zymoseptoria tritici</i>	hyphal tip
28	1M9L1% <i>s/s</i> Salina37°C	71977	<i>Aspergillus fumigatus</i>	single spore

29	4M9L1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 37°C	71978	<i>Aspergillus pseudonominiae</i>	<i>single spore</i>
30	7M9L1% <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C	71979	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>hyphal tip</i>
31	*1M9L1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C	71980	<i>Aspergillus elongatus</i>	<i>single spore</i>
32	4CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C	71981	<i>Alfoldia vorosii</i>	<i>hyphal tip</i>
33	7CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C	71982	<i>Yunnanomyces sp.</i>	<i>hyphal tip</i>
34	10CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C	71983	Não identificado	<i>hyphal tip</i>
35	*1CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C	71984	<i>Scedosporium ellipsoideum</i>	<i>hyphal tip</i>

Anexo 10 – Lista de isolados de bactérias ou leveduriformes

Isolados de bactérias ou leveduriformes	
1	2M9 <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C
2	3M9 <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C
3	4M9L1% <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C
4	5M9L1% <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C
5	8M9L1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 37°C
6	14M9L1% <i>s</i> / <i>sSalina</i> 37°C
7	3M9+4,5% <i>sApicum</i> 37°C
8	*2M9L1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 37°C
9	1CZL1% <i>s</i> / <i>sAp</i> 28°C
10	2CZL1% <i>s</i> / <i>sAp</i> 28°C
11	3CZL1% <i>s</i> / <i>sAp</i> 28°C
12	1CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C
13	3CZL0,1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 28°C
14	9CZL0,1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 28°C
15	*2CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C
16	*4CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C
17	*5CZL1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C
18	*6CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C
19	*7CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C
20	*9CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C
21	*11CZL0,1%+4,5% <i>sApicum</i> 28°C
22	*13CZL0,1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 28°C
23	*15CZL0,1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 28°C
24	*1CZL0,1% <i>s</i> 11% <i>Salina</i> 28°C
25	*5M9L1% <i>s</i> / <i>sApicum</i> 28°C
26	8CZL0,1% <i>s</i> 4,5% <i>Apicum</i> 28°C

27	12CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
28	13CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
29	14CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
30	*3CZL1% <i>s</i> / <i>s</i> Salina28°C
31	*8CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
32	*14CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
33	*17CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
34	*22CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
35	*23CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
36	*25CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
37	*26CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C
38	21MWL1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum28°C
39	22MWL1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum28°C
40	15M9L1% <i>s</i> / <i>s</i> Apicum37°C
41	*3CZL0,1%4,5% <i>s</i> Apicum28°C
42	*2CZL0,1%4,5% <i>s</i> Apicum28°C
43	*2M9L0,1%11% <i>s</i> Salina37°C
44	*1M9L0,1%11% <i>s</i> Salina37°C
45	*3M9L0,1%11% <i>s</i> Salina37°C
46	6M9L1% <i>s</i> / <i>s</i> Salina37°C
47	*4CZL0,1%4,5% <i>s</i> Apicum28°C
48	*4M9L1% <i>s</i> / <i>s</i> Salina37°C
49	*5CZL0,1%4,5% <i>s</i> Apicum28°C
50	*12CZL0,1%4,5% <i>s</i> Apicum28°C
51	*2M9L0,1%4,5% <i>s</i> Apicum37°C
52	19M9L1% <i>s</i> / <i>s</i> Salina37°C
53	7CZL0,1% <i>s</i> 4,5%Apicum28°C

Anexo 11 – Análise de fitohomônios UPLC-MS Xevo TQD

AIA (µg/mL)				
Isolado	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	--	--	--	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	0,1868	--	--	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	0,0148	0,0740	0,0380	--
18MWL1%/s/sApicum28°C	0,0260	--	--	--
20MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
1M3IA (µg/mL)				
Isolado	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	--	--	--	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	0,0192	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	--	--	--	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	0,0016	0,0196	--	--
18MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	0,0016	--
20MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	0,0024	--
5M3IA (µg/mL)				
Isolado	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	--	--	--	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	0,0004	--	0,0276	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	--	0,0304	--	--
18MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	0,0280
20MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
5M2M3IA (µg/mL)				
Isolado	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	--	--	--	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	--	--	--	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
18MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
20MWL1%/s/sApicum28°C	0,0772	--	--	--
2M3IA (µg/mL)				
Isolado	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	0,0068	--	0,0620	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	--	--	--	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	0,0532
18MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	0,0644	--
20MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--

Isolado	Ácido salicílico (µg/mL)			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
*1CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
2MWL0,1%+s4,5%Apicum28°C	--	--	--	--
4CZL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
7M9L1%/s/sSalina37°C	--	--	--	--
15MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
18MWL1%/s/sApicum28°C	--	--	--	--
20MWL1%/s/sApicum28°C	--	0,0092	--	--

APÊNDICES

Apêndice A

Marcador 1 kb DNA Ladder Thermo Scientific

