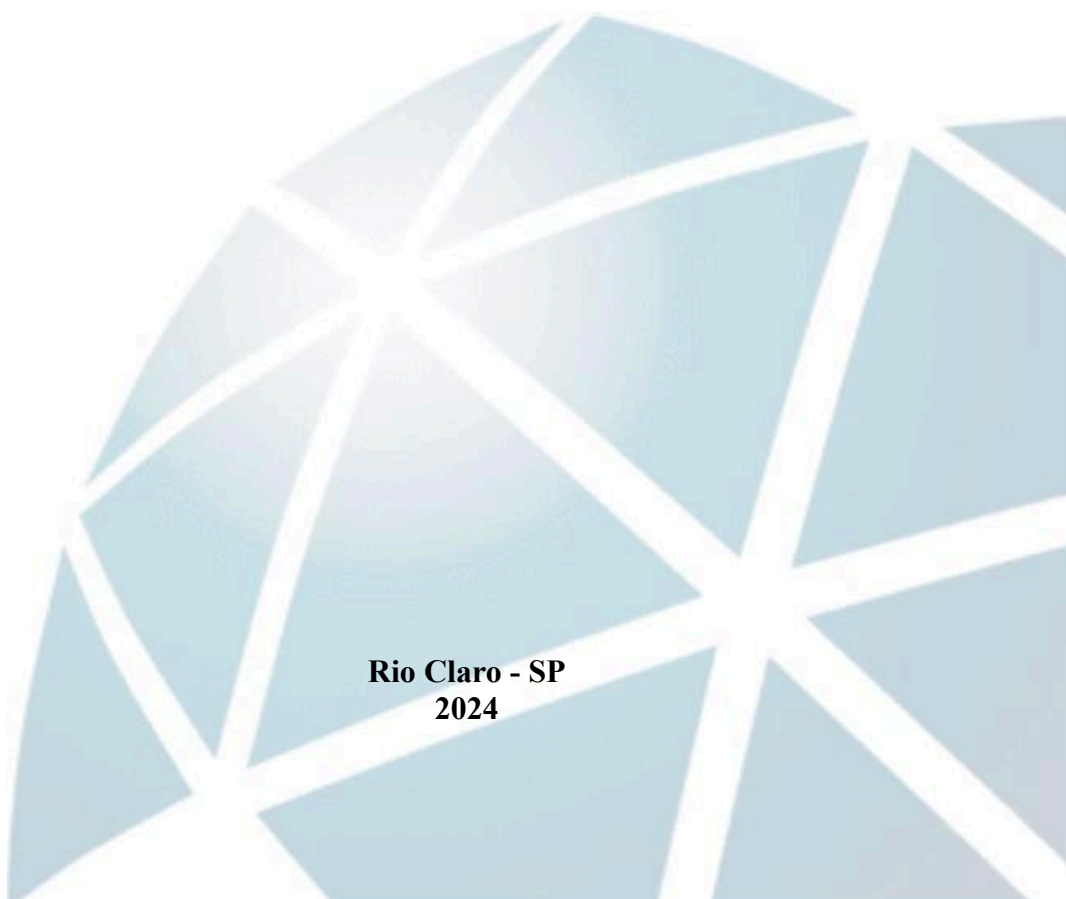

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - INTEGRAL

GABRIEL PERSON DOS SANTOS

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE ORIGEM MARINHA PARA
OBTENÇÃO DE CONSÓRCIO DEGRADADOR DE PETRÓLEO**



Rio Claro - SP
2024

Gabriel Person dos Santos

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE ORIGEM MARINHA PARA OBTENÇÃO
DE CONSÓRCIO DEGRADADOR DE PETRÓLEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Patrícia Giovanella

Coorientador(a): Profa. Dra. Lara Durães Sette

Rio Claro - SP
2024

S237s

Santos, Gabriel Person dos

Seleção de microrganismos de origem marinha para obtenção de consórcio degradador de petróleo / Gabriel Person dos Santos. -- Rio Claro, 2024

55 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Patrícia Giovanella

Coorientadora: Lara Durães Sette

1. Biodegradação de hidrocarbonetos. 2. Biorremediação. 3.
Biossurfactantes. 4. Lipase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GABRIEL PERSON DOS SANTOS

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE ORIGEM MARINHA PARA OBTENÇÃO
DE CONSÓRCIO DEGRADADOR DE PETRÓLEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Patrícia Giovanella

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

Profa. Dra. Lucélia Cabral

Profa. Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Dr. Igor Vinicius Ramos Otero

Aprovado em: 28 de maio de 2024

Assinatura do discente

Assinatura do(a) orientador(a)

Assinatura do(a) coorientador(a)

*Aos meus pais e a toda a minha família que sempre me apoiaram e
incentivaram durante a minha jornada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora Patrícia por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho e ajuda nos experimentos realizados. À minha coorientadora, Lara, por esclarecer as dúvidas que surgiram durante este trabalho. Aos mestrandos Miguel e Yasmin por ajudarem na realização dos experimentos de Lipase, Emulsificação e Degradação. Também, à todos os membros da Central de Recursos Microbianos (CRM-UNESP) e do departamento de Biologia Geral e Aplicada de que tiveram alguma participação no desenvolvimento deste trabalho.

O presente estudo foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) - Processo CNPq nº 440774/2020-9.

O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria (Asimov, 1988, p.281).

RESUMO

O petróleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e devido à sua recalcitrância e frequentes derrames acidentais em ambientes marinhos e costeiros é reconhecido mundialmente como uma ameaça para os ecossistemas e a saúde humana. Uma alternativa eficiente, ecologicamente correta e de baixo custo para mitigar este tipo de contaminação é a biorremediação. A biodegradação de classes específicas de hidrocarbonetos do petróleo varia de acordo com o metabolismo microbiano. Os microrganismos de origem marinha são de particular interesse, devido às adaptações fisiológicas às condições ambientais adversas, bem como pela diversidade metabólica e enzimática que possuem. Enzimas como monooxigenases, dioxigenases e citocromo P450 são responsáveis pela biodegradação das moléculas de hidrocarboneto, enquanto as lipases atuam na hidrólise de triglicerídeos e ligações éster carboxílico, de modo geral, aumentando a biodisponibilidade do poluente aos microrganismos. Em adição, produtos do metabolismo secundário, como os biossurfactantes também possuem papel de destaque devido ao envolvimento no processo de emulsificação entre o petróleo e a água. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar a capacidade de fungos e bactérias de origem marinha em degradar petróleo bruto, bem como analisar a produção de biossurfactantes e lipases por estes microrganismos. O presente projeto de TCC é parte do projeto “Biorremediação de petróleo em sedimentos e água do mar: estrutura e função de comunidades microbianas (MicroBioMaR). Diferentes meios de cultivo foram testados para determinar o meio mais adequado para a análise da biodegradação do petróleo. A análise qualitativa da degradação do petróleo bruto foi feita no meio de cultura selecionado contendo 2% de petróleo bruto. O petróleo foi extraído com hexano e analisado em GC-MS. A emulsificação foi avaliada em tubos de ensaio contendo 1 mL do sobrenadante da cultura livre de células e 1 mL de óleo diesel. A atividade emulsificante foi mensurada pela altura da mistura em comparação com a altura da emulsão formada na interface. A atividade das lipases foi determinada utilizando como substrato sintético o 4-nitrofenil palmitato (p-NPP) em espectrofotômetro a 405 nm. Os melhores resultados de degradação foram observados nos tratamentos com os microrganismos *Sphingobium xenophagum* (41.), *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593), *Acinetobacter beijerinckii* (28.) e *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348), embora todos os fungos e bactérias tenham sido capazes de degradar alguns compostos alifáticos e HPAs. Ademais, o fungo *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) apresentou o melhor índice de emulsificação do óleo diesel (6,1%), seguido da bactéria *Alcanivorax* sp. (85C) (2,3%). Os isolados *Shewanella haliotis* (C10) e *Alcanivorax* sp. (85C) apresentaram a maior atividade de lipase (14,2 U L⁻¹ e 4,4 U L⁻¹, respectivamente). A proposta de estruturação do consórcio degradador de petróleo foi elaborada respaldando-se nos três testes realizados: degradação do petróleo bruto, índice de emulsificação do óleo diesel e atividade das lipases.

Palavras-chave: Biodegradação de hidrocarbonetos; Biorremediação; Biossurfactantes; Lipases

ABSTRACT

Crude oil is a complex mixture of hydrocarbons and due to its recalcitrance and frequent accidental spills in marine and coastal environments, it is recognized worldwide as a threat to ecosystems and human health. An efficient, environmentally friendly, and low-cost alternative to mitigating this type of contamination is bioremediation. The biodegradation of specific classes of petroleum hydrocarbons varies according to microbial metabolism. Microorganisms of marine origin are of particular interest, due to their physiological adaptations to adverse environmental conditions, as well as their metabolic and enzymatic diversity. Enzymes such as monooxygenases, dioxygenases, and cytochrome P450 are responsible for the biodegradation of hydrocarbon molecules, while lipases act in the hydrolysis of triglycerides and carboxylic ester bonds, generally increasing the bioavailability of the pollutant to microorganisms. In addition, products of secondary metabolisms, such as biosurfactants, also play a prominent role due to their involvement in the emulsification process between oil and water. Thus, the present study aimed to evaluate the ability of fungi and bacteria of marine origin to degrade crude oil, as well as analyze the production of biosurfactants and lipases by these microorganisms. This TCC project is part of the project "Bioremediation of oil in sediments and seawater: structure and function of microbial communities (MicroBioMaR). Different culture media were tested to determine the most suitable medium for analyzing petroleum biodegradation. Qualitative analysis of crude oil degradation was done in the selected culture medium containing 2% crude oil. The oil was extracted with hexane and analyzed using GC-MS. Emulsification was evaluated in test tubes containing 1 mL of cell-free culture supernatant and 1 mL of diesel oil. The emulsifying activity was measured by the height of the mixture compared to the height of the emulsion formed at the interface. Lipase activity was determined using 4-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as a synthetic substrate in a spectrophotometer at 405 nm. The best degradation results were observed in treatments with the microorganisms *Sphingobium xenophagum* (41.), *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593), *Acinetobacter beijerinckii* (28.), and *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348), although all fungi and bacteria were able of degrading some aliphatic compounds and PAHs. Furthermore, the fungus *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) showed the best diesel oil emulsification rate (6.1%), followed by the bacteria *Alcanivorax* sp. (85C) (2.3%). The isolates *Shewanella haliotis* (C10) and *Alcanivorax* sp. (85C) showed the highest lipase activity (14.2 U L⁻¹ and 4.4 U L⁻¹, respectively). The proposal for structuring the oil-degrading consortium was prepared based on the three tests carried out: degradation of crude oil, diesel oil emulsification index, and lipase activity.

Keywords: Biodegradation of hydrocarbons; Bioremediation; Biosurfactants; Lipases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	11
Figura 2 – Exemplificação do mecanismo de ação da enzima lipase na hidrólise de um triglicerídeo.....	14
Figura 3 – Fluxograma das atividades do projeto MicroBioMaR.....	16
Figura 4 – Biomassa seca de <i>Paramarasmius palmivorus</i> CRM 593 nos diferentes meios de cultura.....	25
Figura 5 – Comparação do resultado de emulsificação em óleo diesel e petróleo bruto.....	27
Figura 6 – Emulsificação (%) do óleo diesel pelos isolados selecionados.....	28
Figura 7 – Atividade enzimática (U L ⁻¹) das bactérias selecionadas.....	30
Figura 8 – Cubetas contendo extratos enzimáticos de diferentes bactérias.....	30
Figura 9 – Cromatogramas dos padrões C8-C40 <i>Alkanes Calibration Standard</i> e EPA 610 <i>Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix</i>	31
Figura 10 – Cromatograma dos controles negativos, com os respectivos meios acrescidos de petróleo bruto.....	32
Figura 11 – Cromatogramas da degradação do petróleo bruto em diferentes tratamentos testando os isolados bacterianos.....	36
Figura 12 – Cromatogramas da degradação do petróleo bruto em diferentes tratamentos testando os isolados fúngicos.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Microrganismos.....	18
3.2	Seleção do meio de cultivo mais eficiente para análise da biodegradação do petróleo.....	19
3.3	Teste de emulsificação (bactérias e fungos).....	20
3.4	Quantificação das lipases.....	21
3.5	Análise qualitativa da degradação do petróleo bruto.....	22
3.6	Análises Estatísticas.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma fonte de energia versátil amplamente utilizada em diversos segmentos industriais, sendo a matéria-prima utilizada para produzir combustíveis como querosene e gasolina, além de uma variedade de outros compostos derivados do petróleo como plásticos, reagentes químicos, solventes e produtos farmacêuticos (Amran *et al.*, 2022). Apesar da relevância econômica e industrial do petróleo, a contaminação ambiental por este poluente orgânico pode ocorrer por diferentes vias. No ambiente marinho, acidentes envolvendo o derramamento de petróleo ocorrem por meio de falhas em instalações de refinarias costeiras, *offshores*, terminais marítimos, vazamentos de óleo da sentina e do combustível dos navios (Al-Hawash *et al.*, 2018; Carpenter, 2019). Estes acidentes ocasionam danos diretos e indiretos principalmente a vida marinha e costeira que está em contato direto com a fonte de contaminação (Varjani, 2017). O derramamento de petróleo que atingiu a costa brasileira e alcançou estados do Nordeste e Sudeste em agosto de 2019 é um exemplo recente da problemática ambiental causada pela contaminação por hidrocarbonetos em ambientes marinhos (Cabral *et al.*, 2022).

A composição química do petróleo consiste em uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Dentre estes pode-se destacar os: alifáticos (alcenos, alcanos e cicloalcanos), hidrocarbonetos monoaromáticos (xileno, tolueno, benzeno e etilbenzeno) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (antraceno, fluoreno e naftaleno) (Cabral *et al.*, 2022). Alguns destes compostos são apresentados na Figura 1. Além destes compostos, podem ser encontradas pequenas quantidades de nitrogênio, oxigênio, enxofre e metais (Mohammadi *et al.*, 2020).

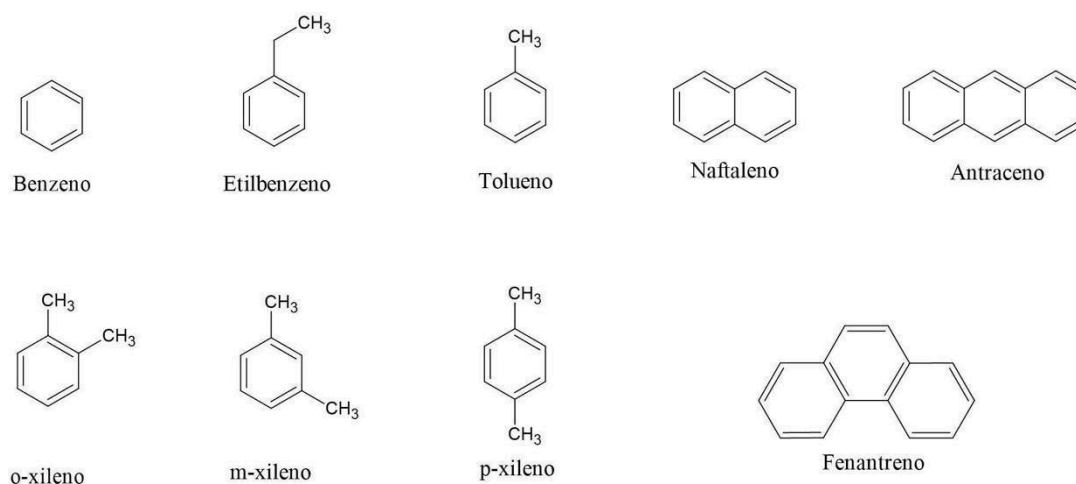


Figura 1. Hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX (benzeno, etilbenzeno, tolueno e isômeros de xileno) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (naftaleno, antraceno e fenantreno). Ambas as

classes de hidrocarbonetos encontradas em petróleo. Elaborado pelo autor.

Os hidrocarbonetos aromáticos e parafenóis contidos no petróleo podem causar efeitos adversos na saúde humana, incluindo danos dérmicos, hematológicos, hepáticos, respiratórios, renais, endócrinos, neurológicos e outros efeitos sistêmicos e somáticos (D'andrea; Reddy, 2014; Ramirez *et al.*, 2017). Ademais, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), também presentes no petróleo, são carcinogênicos, citotóxicos e genotóxicos (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Diante dos impactos ambientais relacionados ao derramamento de petróleo em ecossistemas marinhos e costeiros, a busca por técnicas eficazes de remediação torna-se crucial. As técnicas convencionais de remediação que utilizam métodos físicos e químicos são pouco viáveis economicamente e podem produzir contaminação secundária. Em contrapartida, a biorremediação é uma alternativa mais barata, e ecologicamente correta quando comparada aos métodos convencionais de remediação, além de ser eficiente na mitigação de poluentes ambientais (Giovanella *et al.*, 2023).

Na biorremediação utiliza-se microrganismos para a recuperação de ambientes impactados e isto se deve ao aparato metabólico microbiano, o qual possibilita a degradação de hidrocarbonetos e outros poluentes ambientais na presença ou ausência de oxigênio (Cabral *et al.*, 2022). Diversos microrganismos podem ser utilizados na biodegradação de hidrocarbonetos, incluindo os fungos filamentosos, as leveduras e as bactérias. Neste contexto, poluentes tóxicos podem ser reduzidos pela via metabólica de microrganismos à compostos menos poluentes (Amran *et al.*, 2022; Michel, 2015)

A biorremediação pode ser aplicada tanto *in situ* como *ex situ* por meio da utilização de estratégias como atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação. A atenuação natural consiste na degradação/transformação do poluente pela microbiota nativa, sem qualquer tipo de intervenção. A bioaugmentação consiste na introdução de microrganismos exógenos no local contaminado, os quais foram previamente selecionados com potencial degradador/transformador do poluente, ou com capacidade de produção de biossurfactantes ou lipases (no caso de poluentes oleosos). A bioestimulação consiste na indução do desenvolvimento da microbiota autóctone, por meio da adição de nutrientes e/ou alteração dos parâmetros físicos e químicos (Azubuike; Chikere; Okpokwasili, 2016; Dzionek; Wojcieszynska; Guzik, 2016; Fuentes *et al.*, 2014; Michel, 2015), tendo em vista o fato de que a eficiência da biorremediação é influenciada por fatores físico-químicos como oxigênio, salinidade, pH, temperatura, além da quantidade e qualidade de nutrientes (Michel, 2015).

Os biossurfactantes produzidos pelo metabolismo secundário dos microrganismos apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, com aproximadamente 2000 tipos, que podem variar minimamente ou até apresentar distintas estruturas (Shaimerdenova, U. et al., 2024; Kubicki, S. et al., 2019). Dentre outras funções, eles aumentam a área superficial de substratos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos, e aumentam a biodisponibilidade destes por solubilização ou dessorção. Devido a sua estrutura molecular, com partes hidrofóbicas e hidrofílicas, atuam se agregando nas interfaces entre os hidrocarbonetos e água, diminuindo a tensão superficial e interfacial (Vijayakuma; Saravanan, 2015). Cabe ressaltar que emulsificadores produzidos por microrganismos são biossurfactantes, entretanto, nem todos os biossurfactantes são emulsificadores, sendo o último uma subclasse do grupo dos biossurfactantes (Giovanella et al., 2023). A emulsificação dos hidrocarbonetos é de grande importância para a biorremediação do petróleo bruto, permitindo que haja uma maior biodisponibilidade do poluente em meio aquoso (Ibrahim *et al.*, 2013).

As lipases são hidrolases que atuam em condições aquosas nas ligações éster carboxílico presentes nos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (Figura 2.). As lipases podem ser divididas em três classes: não específicas, lipases 1,3 específicas e lipases ácido graxo específicas (Yao *et al.*, 2021). Os substratos naturais das lipases são triacilgliceróis de cadeia longa, que apresentam baixíssima solubilidade em água, sendo esta reação catalisada na interface lipídio-água. Além disto, atuam de modo geral em reações de esterificação e transesterificação (Bhandari *et al.*, 2021) e na conversão de hidrocarbonetos de cadeia longa contidos no petróleo bruto em outros compostos mais facilmente metabolizáveis por microrganismos (Sperb *et al.*, 2015).

O petróleo bruto pode conter ácidos graxos, óleos e triglicerídeos em sua composição (Jacob; Mohan; Joseph, 2022). No contexto da biorremediação, a atividade desta enzima é utilizada como parâmetro bioquímico e biológico para testar a degradação de hidrocarbonetos contidos no petróleo bruto (Mahmoud *et al.*, 2015). No estudo realizado por Abubakar *et al.* (2024) foi constatada a ação da lipase de isolados bacterianos na degradação de petróleo bruto, indicando a diminuição de uma parcela de hidrocarbonetos exceto tolueno.

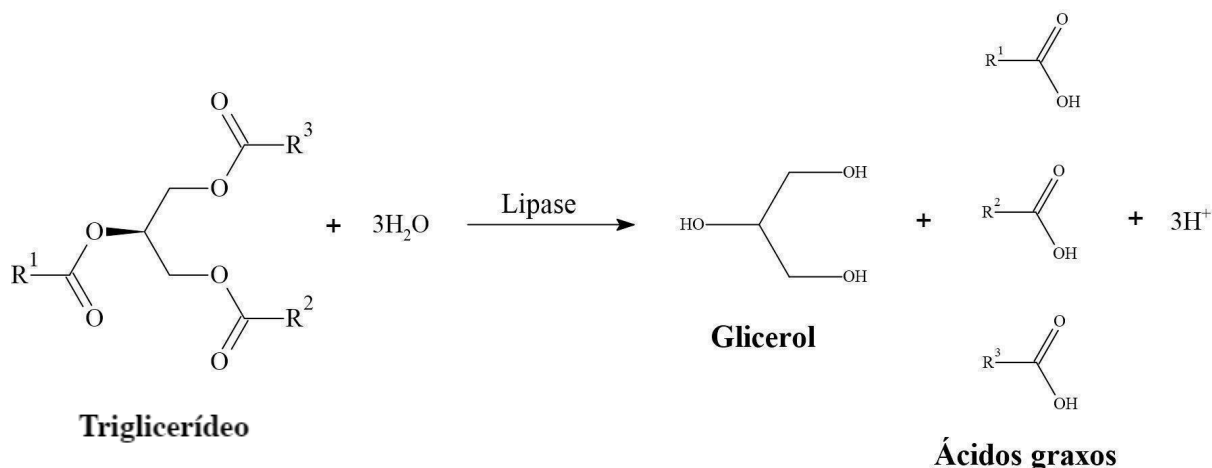


Figura 2. Exemplificação do mecanismo de ação da enzima lipase na hidrólise de um triglicerídeo. Elaborado pelo autor.

Os microrganismos biodegradadores de petróleo têm sido isolados de ambientes marinhos, porém sua capacidade de degradar classes específicas de hidrocarbonetos de petróleo varia de acordo com suas vias metabólicas (Michel, 2015). Eles podem realizar a biodegradação tanto em condições aeróbias, utilizando enzimas como monooxigenases, dioxigenases e citocromo P450 (Abbasian *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2013; Munro *et al.*, 2013). As monooxigenases, incluindo monooxigenases de rubredoxina e monooxigenases de citocromo P450, desempenham papéis chave fundamentais na oxidação de alcanos. Pode-se destacar a enzima alcano hidroxilase (*AlkB*) que é fundamental na oxidação inicial de alcanos. Além disso, outras enzimas como monooxigenase degradadora de alcanos de cadeia longa (*LadA*) e a monooxigenase de ligação à flavina (*AlmA*) também são importantes na assimilação de alcanos de cadeia longa. Na degradação anaeróbia, a degradação de hidrocarbonetos pode ocorrer por meio de vias metabólicas diferentes, envolvendo enzimas como redutases e hidrogenases (Cabral *et al.*, 2022). Quanto às condições anaeróbias, emprega-se diferentes vias e receptores terminais de elétrons, como a redução de nitrato, ferro e metanogênese (Carmona *et al.*, 2009; Fuchs; Boll; Heider, 2011).

Na degradação aeróbia dos HPAs o metabolismo dos microrganismos geralmente inicia pela oxidação do núcleo aromático, formando moléculas intermediárias (*e.g* catecóis, protocatecuatos, gentisatos e hidroxibenzoquinóis) que são hidroxilados. Posteriormente, estas moléculas intermediárias sofrem a clivagem do anel aromático e seus produtos são encaminhados para o metabolismo central. Cabe ressaltar que neste caso a degradação anaeróbia pode ocorrer mesmo em condições aeróbias ou em baixas concentrações de oxigênio, com a atuação de tio ésteres CoA (Fuchs; Boll; Heider, 2011; Pérez-Pantoja

González; Pieper, 2010).

Os hidrocarbonetos alifáticos são degradados com maior facilidade pelos microrganismos quando comparados aos HPAs e hidrocarbonetos alicíclicos (Acer *et al.*, 2016). Alguns hidrocarbonetos com cadeias de 5 a 10 carbonos, em altas concentrações, podem inibir os microrganismos, por serem dispersantes e causar o rompimento da membrana plasmática (Acer *et al.*, 2016). No caso dos hidrocarbonetos de cadeia longa, a biodegradação pode ser prejudicada devido à baixa solubilidade/biodisponibilidade (Liu *et al.* 2022).

Para a biorremediação de petróleo bruto utilizando o metabolismo microbiano, é vantajoso selecionar microrganismos que possuem a capacidade de degradação de uma ampla gama de hidrocarbonetos contidos neste poluente (Acer *et al.*, 2016). Além disso, na elaboração de consórcios procura-se estabelecer microrganismos de diferentes táxons (*e.g* gênero) visando a disposição de um maior *pool* de enzimas utilizáveis na degradação, implicando em diferentes vias metabólicas. Ao elaborar um consórcio deve-se levar em consideração quais moléculas podem ser degradadas pelos respectivos microrganismos selecionados e/ou quais moléculas biossurfactantes estes podem produzir para facilitar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos na degradação. A salinidade do meio em que o consórcio ficará deve ser avaliado, pois influencia no crescimento e na ativação ou inibição de enzimas chave no processo de degradação (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) está associado ao projeto CNPq 440774/2020-9 intitulado “Biorremediação de petróleo em sedimentos e água do mar: estrutura e função de comunidades microbianas (MicroBioMaR)”, sob a coordenação da Profa. Dra. Lara D. Sette (UNESP/Rio Claro), submetido a Chamada CNPq/MCTI 06/2020 – Pesquisa e Desenvolvimento para Enfrentamento de Derramamento de Óleo na Costa Brasileira - Programa Ciência no Mar do MCTI (vigência: 20/06/2023 a 30/06/2026 – Financiamento: R\$ 526.600,00). No contexto do projeto MicroBioMar, o presente projeto objetiva selecionar microrganismos marinhos (fungos e bactérias) eficientes na degradação/emulsificação de petróleo bruto.

Dessa forma, os resultados deste estudo contribuirão para a seleção dos microrganismos que integrarão consórcios microbianos a serem utilizados em pesquisas subsequentes envolvendo sedimentos marinhos e água do mar, como apresentado no fluxograma abaixo (Figura 3.).

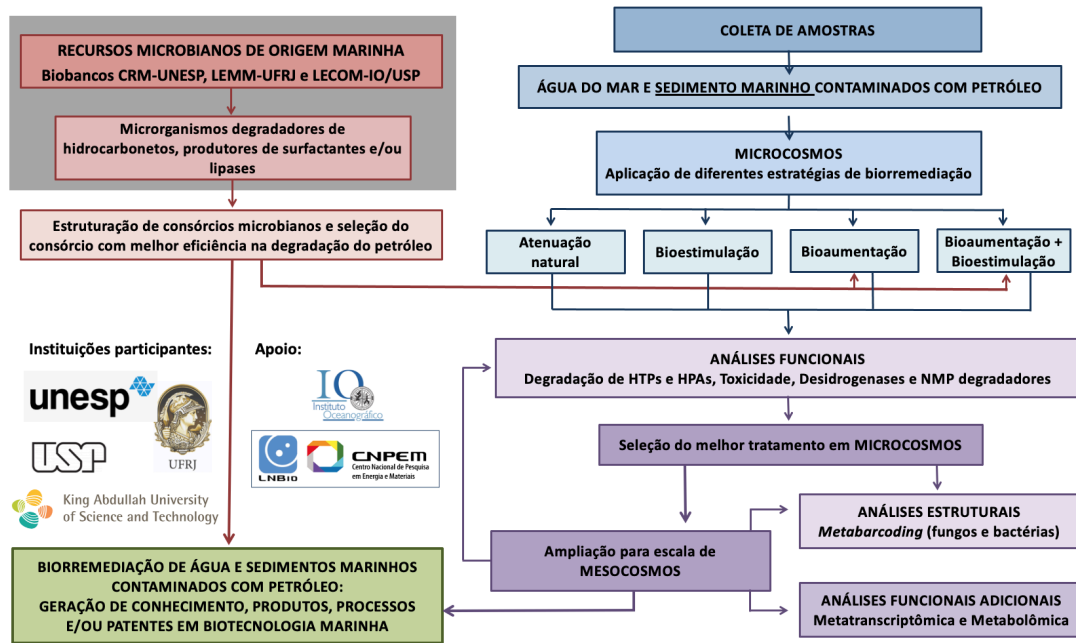


Figura 3. Fluxograma das atividades do projeto MicroBioMaR (Processo CNPq 440774/2020-9), ao qual o presente projeto de TCC está vinculado (atividades destacadas em cinza).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivos avaliar a capacidade de fungos e bactérias de origem marinha em degradar petróleo bruto, bem como analisar a produção de biossurfactantes e lipases por estes microrganismos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o meio de cultivo mais adequado para o crescimento dos microrganismos de origem marinha;
- Quantificar a produção de lipases e constatar a capacidade de emulsificação dos microrganismos de origem marinha;
- Avaliar qualitativamente a biodegradação do petróleo bruto presente em meio de cultivo determinado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Neste estudo, foram avaliados 7 isolados fúngicos e 10 bactérias (Quadro 1), ambos de origem marinha e com histórico de degradação de hidrocarbonetos, produção de enzimas degradativas e/ou biossurfactantes dos biobancos microbianos: Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), Coleção de Bactérias do Laboratório LEMM do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LEMM/UFRJ, colaboração com o Prof. Dr. Alexandre S. Rosado docente da KAUST e Profa. Dra. Flavia Lima do Carmo), e Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto Oceanográfico da USP (LECOM-IO/USP, colaboração com a Profa. Dra. Vivian H. Pellizari).

Quadro 1 - Isolados fúngicos e bacterianos utilizados no presente estudo.

Código original	Código utilizado neste estudo	Espécie	Origem	Local de coleta	Biobanco
C1	C1	<i>Brucella intermedia strain</i>	<i>Mussimilia harttii</i>	Abrolhos	LEMM/UFRJ
C10	C10	<i>Shewanella haliotis strain</i>	<i>Millepora alcicornis</i>	Abrolhos	LEMM/UFRJ
P24	P24	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Siderastrea stellata</i>	Bahia	LEMM/UFRJ
SED 07	SED 07	<i>Acinetobacter</i> sp.	Manguezal	Marambaia (RJ)	LEMM/UFRJ
28	28.	<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	Água do mar	Bacia de Santos (SP)	LEMM/UFRJ
41	41.	<i>Sphingobium xenophagum</i>	Água do mar	Bacia de Santos (SP)	LEMM/UFRJ
M9.MAMS.R2.1 4d.3	M9	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Água de superfície	Saco do Mamanguá (RJ)	LECOM-IO/ USP
M7.MAMS.R2.7 d.1.2	M7	<i>Zhihengliuella</i> sp.	Água de superfície	Saco do Mamanguá (RJ)	LECOM-IO/ USP
AR02.MAMS.R 2.7d.1.2	AR02	<i>Stutzerimonas balearica</i>	Água de superfície	Lagoa de Araruama (RJ)	LECOM-IO/ USP
LECOM 85C	85C	<i>Alcanivorax</i> sp.	Sedimento	Monte Carbonático Alpha Crucis - Baía de Santos (SP)	LECOM-IO/ USP
CRM 336	CRM 336	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Mussimilia hispida</i>	Praia do Portinho (SP)	CRM/UNESP

			(cnidário)		
CRM 348	CRM 348	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Palythoa variabilis</i> (cnidário)	Praia do Portinho (SP)	CRM/UNESP
CRM 354	CRM 354	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Palythoa caribaeorum</i> (cnidário)	Praia Preta (SP)	CRM/UNESP
CRM 593	CRM 593	<i>Paramarasmius palmivorus</i>	<i>Amphimedon viride</i> (esponja)	Praia do Guaecá (SP)	CRM/UNESP
CRM 470	CRM 470	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Petromica citrina</i>	Praia Saco do Poço (SP)	CRM/UNESP
CRM 1241	CRM 1241	<i>Peniophora</i> sp.	<i>Amphimedon viride</i> (esponja)	Face sul da Ilha de Toque-Toque (SP)	CRM/UNESP
CRM 592	CRM 592	<i>Tinctoporellus</i> sp.	<i>Dragmacidon reticulatum</i>	Ilha de Toque-Toque (SP)	CRM/UNESP

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Seleção do meio de cultivo mais eficiente para análise da biodegradação do petróleo

Para selecionar o meio de cultivo mais adequado visando a biodegradação do petróleo, foi utilizado como modelo o fungo basidiomiceto de origem marinha *Paramarasmius palmivorus* CBMAI 1062 (=CRM 593), isolado a partir de amostra de esponja marinha *Amphimedon viridis* (Menezes *et al.*, 2010).

Para isso, foram retirados 3 *plugs* (8 mm) do isolado fúngico e colocados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de um dos três meios de cultivo descritos a seguir: Meio mínimo mineral (MM1) Richard e Vogel (1999) (KCl 0,7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 4 mg L⁻¹, FeSO₄ 0,2 mg L⁻¹, MnCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂ 0,2 mg L⁻¹); Água do mar artificial modificada com meio mínimo mineral (A+B + MM1) (KCl 0,7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 4 mg L⁻¹, FeSO₄ 0,2 mg L⁻¹, MnCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 1,47 g L⁻¹, SrCl₂.6H₂O 0,04 g L⁻¹, NaCl 23,48 g L⁻¹, NaHCO₃ 0,19 g L⁻¹, KBr 0,1 g L⁻¹, H₃BO₃ 0,03 g L⁻¹); e meio mínimo mineral acrescido de NaCl (MM1+NaCl) (KCl 0,7 g L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 3 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 4 mg L⁻¹, FeSO₄ 0,2 mg L⁻¹, MnCl₂ 0,2 mg L⁻¹, CaCl₂ 0,2 mg L⁻¹, 23,48 g L⁻¹ NaCl). Foram utilizados como fonte de carbono nos diferentes meios de cultivo 2% de petróleo bruto e como controle positivo 0,2% de dextrose. O fungo foi cultivado por 21 dias a 28 °C e 140 rpm.

O crescimento do fungo modelo nos diferentes meios de cultivo foi analisado pela

massa seca. Foram medidas as massas dos papéis filtro previamente secos em estufa a 105 °C por 12 h. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado com o auxílio de uma bomba a vácuo e o papel filtro, e a biomassa do respectivo microrganismo foi seca em estufa a 105 °C por 12 h. A biomassa seca foi medida e determinada pela diferença entre a massa do papel filtro e a biomassa seca.

Ao longo dos experimentos foi constatado que os isolados bacterianos não apresentaram crescimento em meio mínimo mineral (mesmo com glicose como fonte de carbono), portanto, foi necessária a definição de um novo meio de cultura para as bactérias para os experimentos de degradação de petróleo bruto. Diante destas considerações, os seguintes meios e suas respectivas formulações foram testados para todas as bactérias e alguns fungos (verificamos primeiramente o sucesso de crescimento das bactérias para depois testar os meios de interesse com os fungos): Ágar Nutriente (5,0 g L⁻¹ peptona, 5,0 g L⁻¹ NaCl, 1,5 g L⁻¹ extrato de carne, 1,5 g L⁻¹ extrato de levedura, 15,0 g L⁻¹ ágar); Meio malte 2% (20,0 g L⁻¹ de extrato de malte e 15,0 g L⁻¹ de ágar); *Marine Broth* + Dextrose ((NH₄)₂SO₄ 2,6 g L⁻¹, H₃BO₃ 22,0 mg L⁻¹, CaCl₂ 1,8 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 8,0 mg L⁻¹, FeCl₃ 0,15 g L⁻¹, MgCl₂ 5,9 g L⁻¹, MgSO₄ 3,24 g L⁻¹, KBr 80,0 mg L⁻¹, KCl 0,55 g L⁻¹, NaHCO₃ 0,16 g L⁻¹, NaCl 19,45 g L⁻¹, NaF 2,4 mg L⁻¹, Na₂SiO₃ 4,0 g L⁻¹, SrCl₂ 34,0 mg L⁻¹, Dextrose 5,0 g L⁻¹, Ágar 15,0 g L⁻¹); Meio *sea salt* + Dextrose (*sea salt* Sigma-Aldrich S9883 40 g L⁻¹, Dextrose 5,0 g L⁻¹, Ágar 15,0 g L⁻¹); Meio água peptonada modificada (peptona 5,0 g L⁻¹, NaCl 5,0 g L⁻¹, Ágar 15,0 g L⁻¹); Meio 1 (peptona 5 g L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ ágar); Meio 2 (peptona 10 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ ágar); Meio 3 (peptona 5 g L⁻¹, extrato de levedura 1 g L⁻¹, glicose 0,5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ ágar); Meio 4 (peptona 2,5 g L⁻¹, extrato de levedura 0,75 g L⁻¹, extrato de carne 0,75 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ ágar); Meio 5 (peptona 1,7 g L⁻¹, extrato de carne 0,5 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, 15 g L⁻¹ ágar).

3.3 Teste de emulsificação (bactérias e fungos)

Para a preparação do pré-inóculo as bactérias foram cultivadas em caldo nutriente (5 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de NaCl, 1,5 g L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 g L⁻¹ de extrato de levedura) a 28 °C por 24 h sob agitação contínua de 140 rpm. Os ensaios de emulsificação foram feitos em caldo nutriente (10 mL) o qual foi inoculado com uma alíquota de pré-inóculo suficiente para se obter uma absorbância de 0,1 a 600 nm, seguido de incubação a 28 °C por 96 h sob agitação contínua de 140 rpm. Os fungos foram cultivados previamente em placas de Petri com meio malte 2% (descrito em 2.2) a 28 °C por 7 dias. Posteriormente,

um *plug* de 8 mm foi adicionado à 15 mL de meio malte 2% e cultivado por 10 dias a 28°C e 140 rpm. Após a incubação dos fungos e bactérias, 1,5 mL dos cultivos foram centrifugados por 5 min a 10000 rpm e o sobrenadante da cultura livre de células (1 mL) foi adicionado a 1 mL de óleo diesel. A solução foi homogeneizada por 2 min a 3000 rpm (vortex) e deixada em repouso por 24 h à temperatura ambiente. Para avaliar a atividade emulsificante, a altura da mistura foi mensurada bem como a altura da emulsão formada na interface. Os valores foram aplicados na fórmula descrita abaixo (Pruthi; Cameotra, 1997):

$$\text{Atividade emulsificante (\%)} = \frac{\text{Altura emulsão}}{\text{Altura mistura}} \times 100$$

Como controle positivo foi utilizado Triton X (2,8 g L⁻¹) e, como controle negativo caldo nutriente sem inóculo (para as bactérias) e meio malte 2% sem inóculo (para os fungos).

3.4 Quantificação das lipases

A preparação dos pré-inóculos das bactérias foi realizada em meio nutriente (5g L⁻¹ de peptona, 5g L⁻¹ de NaCl, 1,5 g L⁻¹ de extrato de carne e 1,5g L⁻¹ de extrato de levedura), incubando-as por 24 h a 140 rpm e 28 °C. Deste cultivo, foi utilizado pré-inóculo suficiente para se obter uma absorbância de 0,1 a 600 nm em meio nutriente ao qual foram adicionados 300 µL de azeite de oliva filtrado em filtro estéril de 0,22 µm. O meio inoculado foi incubado por 96 h a 28 °C sob agitação contínua de 140 rpm. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CRM 748 foi utilizada como controle positivo.

Para a preparação dos inóculos dos fungos foi retirado 1 *plug* de 8 mm e inoculado em tubos contendo 15 mL de meio malte 2% (20 g L⁻¹ de extrato de malte) e 300 µL de azeite de oliva filtrado em membrana estéril de 0,22 µm, incubando-os por 10 dias, 140 rpm a 28 °C.

Após o período de incubação, o meio foi centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a quantificação da atividade lipolítica. A atividade das lipases foi determinada utilizando como substrato sintético o 4-nitrofenil palmitato (p-NPP). A reação consistiu em 100 µL do extrato enzimático (sobrenadante sem células), 600 µL de água destilada, 100 µL de tampão Tris-HCl (0,5 M - pH 8,0) e 200 µL de p-NNP (2,5 mM). A hidrólise do p-NPP foi determinada a 40 °C, acompanhando a liberação do íon 4-nitrofenol a cada 2 min por 18 min em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de 4-nitrofenol por minuto sob as condições descritas. O cálculo da atividade enzimática foi calculado utilizando a seguinte

equação:

$$U/L = \frac{\Delta A.V.10^6}{\epsilon.R.t}$$

ΔA : Diferença entre absorbância final e inicial;

V : Volume da reação (mL);

10^6 : Conversão dos mols de ϵ para μmols ;

ϵ : Coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

R : Quantidade do caldo enzimático (mL);

t : Tempo de reação (min).

3.5 Análise qualitativa da degradação do petróleo bruto

A preparação do inóculo dos fungos filamentosos para os experimentos de degradação foi feita com a inoculação dos isolados fúngicos em placas de Petri contendo Ágar Malte 2% (20 g L⁻¹ de extrato de malte e 20 g L⁻¹ de ágar). As placas foram incubadas por cinco dias a 28 °C. Após esse período, foi feita a remoção de 3 *plugs* de 8 mm que foram transferidos para Erlenmeyers contendo MM1 (descrito em 3.2) e 2 % de petróleo bruto, incubados por 21 dias a 28 °C e 140 rpm.

Para a preparação dos inóculos bacterianos foi realizado o cultivo dos isolados em caldo nutriente (5 g L⁻¹ de peptona e 3 g L⁻¹ de extrato de carne) e incubados por 24 h a 28 °C sob agitação de 140 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 5000 rpm por 4 min (28 °C) e lavadas com 30 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril, sendo este procedimento repetido duas vezes. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi homogeneizado com 10 mL de solução salina. Estas células foram mantidas por 12 h a 28 °C agitação de 140 rpm para o esgotamento das reservas energéticas. Após esta etapa, estas células foram utilizadas como inóculo para os ensaios de degradação. Frascos contendo 50 mL do meio selecionado (Meio 1, Quadro 2) foram inoculados até se obter a densidade óptica de 0,1 a 600 nm. Em seguida foram adicionados 2% de óleo bruto em cada um dos frascos e incubados por 14 dias a 28 °C e 140 rpm no escuro.

Após o cultivo, a eficiência da degradação foi acessada pela análise dos hidrocarbonetos totais remanescentes por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). O petróleo foi extraído dos cultivos com hexano. Resumidamente, 50 mL da cultura foi adicionado a 50 mL de hexano, agitado a 170 rpm por 30 min a 28 °C. Após este procedimento, os extratos (meio de cultura + microrganismo e hexano) foram filtrados com papel qualitativo (80 g) e auxílio de uma bomba de vácuo. Este conteúdo foi vertido para um

funil de separação onde a fase aquosa foi retirada e submetida a uma segunda extração (50 mL de fase aquosa e 50 mL de hexano. Quanto aos extratos bacterianos, o mesmo procedimento foi realizado, entretanto, não houve a etapa de filtração com papel qualitativo (80 g).

Para a retirada de extrato aquoso remanescente foram adicionados 5 g de sulfato de sódio anidro. Após esta etapa, o sobrenadante foi diluído para a concentração (1:100), filtrado em membrana de Nylon e poros de 0,22 μm . Os extratos da triplicata foram combinados de modo a se obter 1 amostra de cada microrganismo testado para a realização das análises por GC-MS (Bidja abena et al., 2019). Como controle da degradação abiótica, foi utilizado o meio de cultivo com petróleo bruto, incubado nas mesmas condições dos tratamentos e não inoculado com os microrganismos.

A biodegradação do petróleo bruto foi estimada com base na diminuição dos picos detectados por GC-MS -QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão) com a coluna Rtx-5MS (0.25mm, 30m – Restek, Estados Unidos). Foi injetado 1 μL de amostra a temperatura 300 °C enquanto a temperatura da coluna foi de 60 °C a 300 °C com uma rampa de 8 °C min^{-1} . Aos 300 °C a temperatura da coluna foi mantida por 10 min. O hélio foi empregado como gás de arraste com vazão de 2 mL min^{-1} . Os dados de espectrometria de massa foram adquiridos no modo de ionização de elétrons (70 eV). A temperatura de interface para MS foi fixada em 300 °C. A faixa de massa (m/z) foi selecionada em 35-550 para toda a análise. A identificação dos compostos foi realizada utilizando o banco de dados da biblioteca do equipamento e por comparação pelo padrão para policíclicos aromáticos (EPA 610 *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix*, CRM 48743, Sigma Aldrich) e pelo padrão para os alcanos C8-C40 (C8-C40 *Alkanes Calibration Standard*, 40147, Sigma Aldrich).

3.6 Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e realizados o teste de Tukey para dados paramétricos e o Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos para comparações de médias utilizando o software Minitab. O valor de p considerado foi de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes meios de cultivo foram testados conforme as metodologias (Item 3.2 e 3.3). O isolado *P. palmivorus* CRM 593 foi capaz de crescer em meio mínimo mineral (MM1) nos diferentes meios contendo dextrose 0,2% (Figura 4. A). É evidenciado que as concentrações salinas promovidas pelos meios contendo NaCl e água do mar artificial modificada (A+B) (formulações no item 3.2) promovem um maior crescimento do fungo, sendo o meio MM1 + A+B+ dextrose 0,2% o mais efetivo ($0,1 \pm 0,003$ g). Os testes estatísticos apontam que os dados não seguem uma distribuição normal ($p < 0,05$). Ao realizar o teste não paramétrico de Kruskal Wallis chega-se em um valor de $p = 0,027$, indicando diferença significativa entre as amostras.

Paralelamente, este isolado foi capaz de crescer em MM1 acrescido de petróleo bruto 2% e em diferentes concentrações salinas (Figura 4. B). Os testes estatísticos apontam que os dados seguem uma distribuição normal ($p > 0,05$). Ao realizar o teste paramétrico de Tukey identifica-se dois grupos distintos: a (MM1 + A+B + petróleo) e b (MM1 + NaCl + petróleo; MM1 + petróleo). Notavelmente o maior crescimento foi obtido ao submeter este fungo ao meio MM1 + A+B + petróleo 2% ($0,32 \pm 0,02$ g), corroborando com os testes estatísticos que este meio é significativamente diferente dos outros dois testados.

Estudos realizados por Huang *et al.* (2011) ressaltam que a salinidade no meio de cultura de fungos de origem marinha pode ter efeito promotor ou inibidor do crescimento. Dos fungos marinhos testados pelo autor, 43 (91,5%) obtiveram crescimento otimizado quando cultivados em meios de 3 a 6% de NaCl. No presente estudo utilizamos 2,35% ($23,48 \text{ g L}^{-1}$) de NaCl nos meios contendo água do mar artificial modificada e o próprio NaCl. O crescimento positivo do fungo modelo em MM1 acrescido de petróleo bruto e água do mar artificial modificada permitiria que este meio fosse utilizado para os testes de degradação de petróleo pelos fungos (Item 3.4.), porém devido a quantidade de sais na constituição tanto do meio mínimo mineral, quanto na água do mar artificial, houve precipitação. Devido a este contratempo, optamos por utilizar o meio MM1 para os ensaios de degradação pelos fungos.

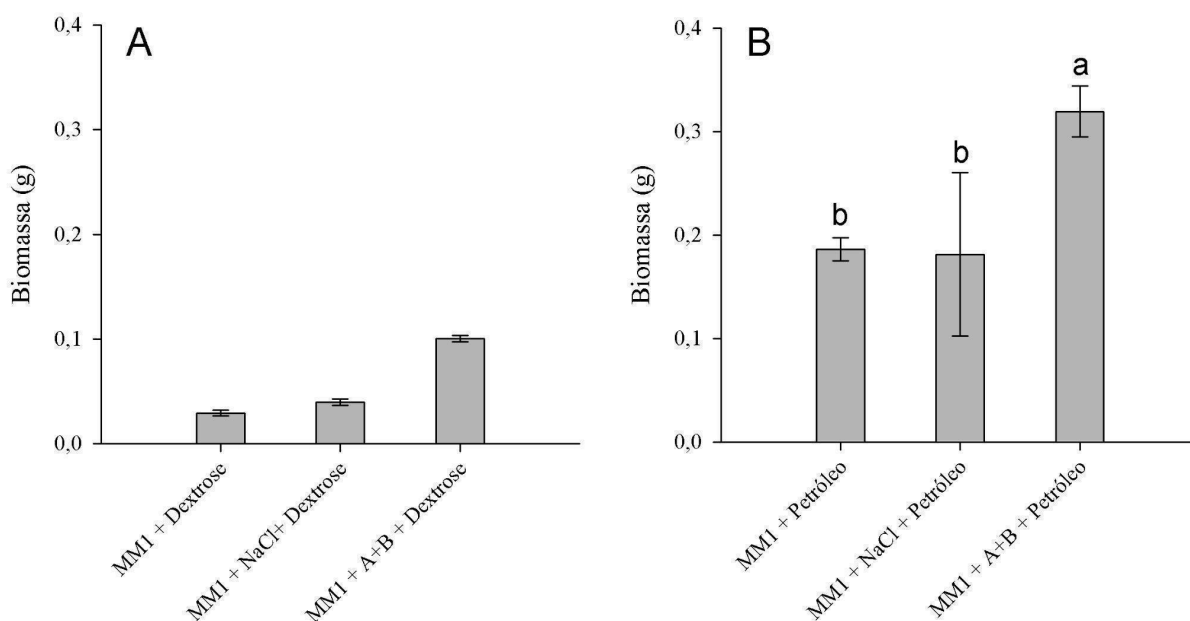


Figura 4. Biomassa seca de *Paramarasmius palmivorus* CRM 593 nos diferentes meios de cultura, acrescido de 0,2% de dextrose como fonte de carbono (A) e acrescido de 2% de petróleo bruto como fonte de carbono (B). Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao longo dos experimentos foi constatado que a maioria dos isolados bacterianos não apresentaram crescimento em MM1 (mesmo com glicose como fonte de carbono, dados não mostrados), sendo necessário avaliar o crescimento em outros meios de cultura. Nestes ensaios, as bactérias não apresentaram crescimento em Meio *Marine Broth* + Dextrose e Meio *sea salt* + Dextrose, também, apenas algumas cresceram em Malte 2% e meio Água Peptonada modificada. De modo geral, as formulações dos Meios de 2 ao 5 apresentaram o crescimento da maioria das bactérias, entretanto, o Meio 1 foi o que obteve crescimento para todas as bactérias e a maioria dos fungos (Quadro 2). Assim, optou-se por utilizar o Meio 1 para as bactérias nos experimentos de degradação de petróleo bruto. O Meio 1 apresenta fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas em sua constituição (descrito 3.2), embora em concentrações muito abaixo do meio ágar nutriente, portanto, este meio de cultivo parece ser mais adequado para se obter a degradação do petróleo bruto.

Quadro 2 - Crescimento dos microrganismos após 48 h de incubação a 28 °C em placas de Petri contendo diferentes formulações de meio de cultura.

	Ágar Nutriente	Malte 2%	<i>Marine Broth</i> + Dextrose	Meio <i>sea salt</i> + Dextrose	Meio Água Peptonada modificado	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5
C1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
C10	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
P24	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
SED 07	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
28.	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
41.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
M9	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M7	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AR02	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
85C	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
CRM 336	+	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
CRM 348	+	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
CRM 354	+	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
CRM 470	+	+	NA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
CRM 1241	-	+	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA
CRM 592	-	+	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA

Quadro 2. O sinal (+) indica crescimento positivo, NA indica que os respectivos microrganismos não foram testados no meio e (-) indica que não houve crescimento.

No presente trabalho analisou-se a capacidade dos microrganismos em emulsificar óleo diesel. Em um contexto de um consórcio de microrganismos degradadores de petróleo, a produção de biossurfactantes se torna vantajosa, pois permite biodisponibilizar os componentes do petróleo que normalmente não estariam biodisponíveis para os microrganismos, especialmente hidrocarbonetos de cadeias longas que possuem baixa solubilidade em água (Liu *et al.*, 2022). Ao utilizarmos microrganismos emulsificadores em

um consórcio tendemos a permitir uma maior degradação do espectro de hidrocarbonetos presentes no meio.

Previamente foi realizado o experimento de emulsificação em petróleo bruto 2% (Figura 5. A), entretanto, a emulsão deste método era pouco visível, inviabilizando sua medição. Na metodologia presente neste estudo optou-se por utilizar óleo diesel 2% (Figura 5. B), facilitando a identificação da emulsão.

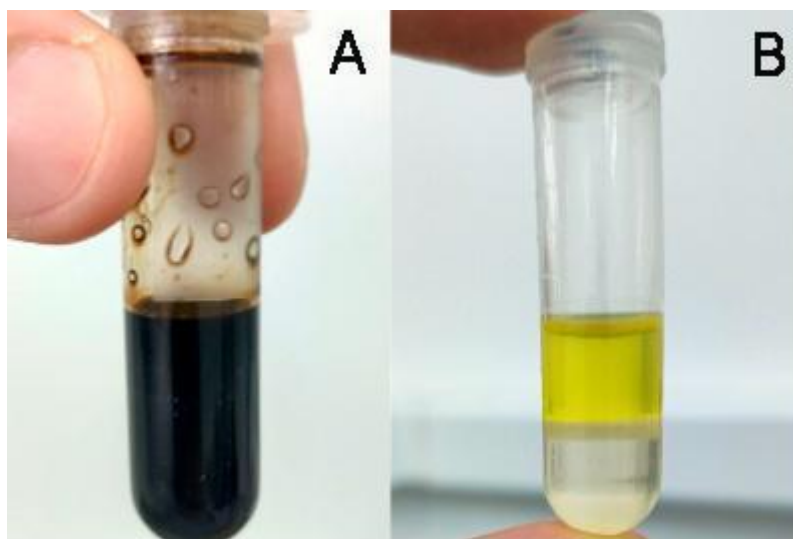


Figura 5. Comparação do resultado de emulsificação em petróleo bruto 2% (A) e óleo diesel 2% (B).

Os resultados das emulsificações apontam que algumas bactérias obtiveram porcentagens de emulsificação, tais como: *Alcanivorax* sp. (85C) (2,3 %), *Acinetobacter* sp. (SED 07) (1,2 %) e *Sphingobium xenophagum* (41.) (0,8 %) (Figura 6. A). Ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que há diferenças estatísticas significativas entre os microrganismos avaliados.

A maioria das espécies do gênero *Alcanivorax* são bactérias marinhas degradadoras de petróleo estritas e obrigatórias, assim, produzem uma variedade de biossurfactantes de diferentes estruturas: glicolipídios, lipopeptídeos, ramnolipídios, entre outros. São comumente encontradas em locais com derramamentos acidentais de petróleo e inseridas a consórcios naturais nestes ambientes. A capacidade de emulsificação do óleo diesel foi evidente e os resultados corroboram com a literatura (Kubicki *et al.*, 2019; Olivera *et al.*, 2009; Qiao; Shao, 2010). Diversos isolados de *Acinetobacter* sp. possuem a capacidade de produzir biossurfactantes e promover a emulsificação de hidrocarbonetos não hidrofílicos contidos em seus respectivos meios de crescimento (Bao *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2012; Moshtagh; Hawboldt; Zhang, 2021; Ohadi *et al.*, 2017). No presente estudo, os isolados do gênero *Acinetobacter* apresentaram distintas intensidades de emulsificação. O isolado SED 07

apresentou uma emulsificação de 1,2 %, enquanto *Acinetobacter beijerinckii* (28.) apresentou uma emulsificação quase nula (0,04 %). Cabe ressaltar que as condições de cultivo que estes isolados foram submetidos, como: pH, fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e salinidade podem alterar a produção de biossurfactantes e, conseqüentemente, a emulsificação (Moshtaghi; Hawboldt; Zhang, 2021). Poucas bactérias do gênero *Sphingobium* possuem a capacidade de produzir biossurfactantes (Dechsakulwatana *et al.*, 2022). No presente estudo, *Sphingobium xenophagum* (41.) foi capaz de produzir biossurfactantes.

Todos os fungos apresentaram maior emulsificação de óleo diesel quando comparados com as bactérias selecionadas. As análises estatísticas revelaram que os melhores resultados de emulsificação foram obtidos com os fungos *Aspergillus sclerotiorum* CRM 348 (6,1 %), *Tinctoporellus* sp. CRM 1241 (4,6 %) e *Cladosporium cladosporioides* CRM 354 (4,3 %) ($p = 0,07$) (Figura 6. B).

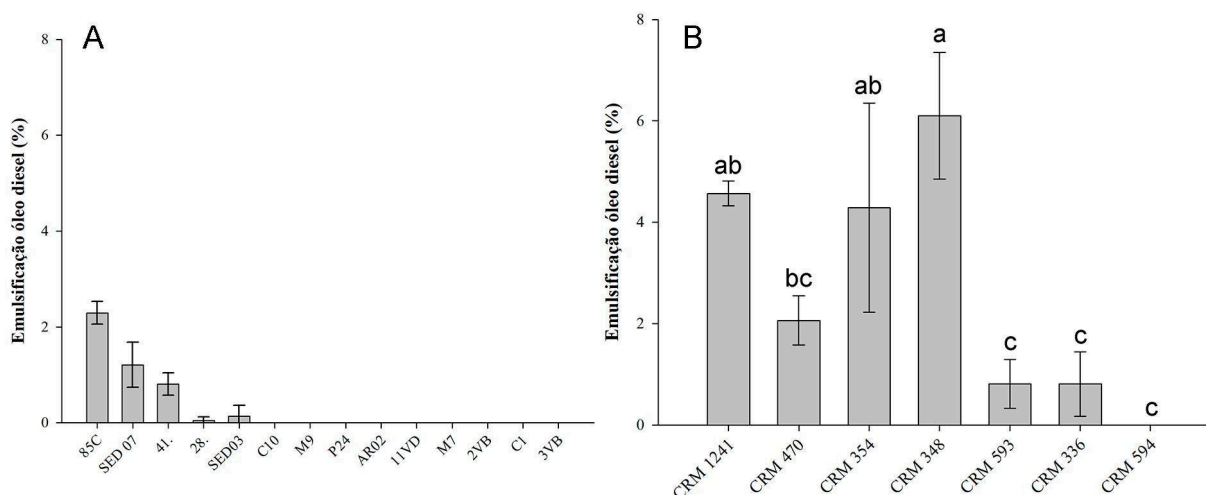


Figura 6. Emulsificação (%) do óleo diesel pelos isolados selecionados após 24 h de incubação Bactérias (A) e fungos (B). Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados indicam que houve atividade enzimática de *Shewanella haliotis* (C10), *Alcanivorax* sp. (85C), *Acinetobacter beijerinckii* (28.) (Figura 7). Ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que há diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Quanto aos fungos, nenhum dos isolados apresentaram atividade de lipase (dados não mostrados).

O isolado *Shewanella haliotis* (C10) apresentou atividade de lipase de $14,2 \text{ U L}^{-1}$. Estudos realizados por Joseph e Chakraborty (2018), relataram a atividade desta classe de enzimas em

Shewanella algae de 46,1 U mL⁻¹, entretanto não foi induzido por azeite de oliva. Resultados obtidos por Ananthi *et al.* (2016), demonstraram que *Shewanella* sp. CMST GISA-MSU teve uma atividade de lipase de 227 U mL⁻¹ em condições otimizadas. Apesar do resultado obtido deste isolado no presente estudo divergir dos resultados obtidos por outros autores, visualmente, *S. haliotis* (C10) apresenta atividade lipolítica. Na Figura 8. pode-se visualizar a hidrólise (catalisada pela lipase) do p-NPP produzindo ácido palmítico e 4-nitrofenol, apresentando coloração amarela clara devido ao 4-nitrofenol. O isolado *S. haliotis* (C10) demonstra promissora atividade lipolítica, entretanto, novos estudos são necessários para verificar suas condições ótimas de produção e atividade.

O isolado *Alcanivorax* sp. (85C) apresentou atividade de lipase de 4,4 U L⁻¹. Resultados obtidos por Kadri *et al.* (2018) demonstraram que *Alcanivorax borkumensis* produziu 71 U mL⁻¹ e 47 U mL⁻¹ de lipase quando submetida aos substratos contendo óleo de motor e hexadecano, respectivamente. Ananthivel *et al.* (2016) demonstraram que o isolado *Alcanivorax* sp. GI-CMST1 produziu 331,5 U mL⁻¹ de lipase sob condições otimizadas e induzidas por 0,5 µL de azeite de oliva. O isolado *Alcanivorax* sp. (85C) apresentou baixa atividade de lipase frente a outros estudos, entretanto cabe ressaltar que ao submeter este isolado a condições otimizadas de produção pode-se obter maiores valores.

O isolado *Acinetobacter beijerinckii* (28.) apresentou atividade de lipase de 6,9 U L⁻¹. Resultados obtidos por Dharmsthiti *et al.* (1998) registraram a atividade enzimática de *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 de 6,1 U mL⁻¹ ao utilizar azeite de oliva como indutor. Resultados obtidos por Kumaraswamy e Singaram (2022), revelaram a atividade de 3,9 U mL⁻¹ na lipase produzida por *Acinetobacter* sp. KSPE71 também em azeite de oliva e com condições otimizadas de cultivo. No estudo de Ahmed, Raghavendra e Madamwar (2010), foi investigado a produção de lipases pela cepa *Acinetobacter* sp. EH28 sob indução em meio suplementado com azeite de oliva, resultando em uma atividade de 3,8 U mL⁻¹.

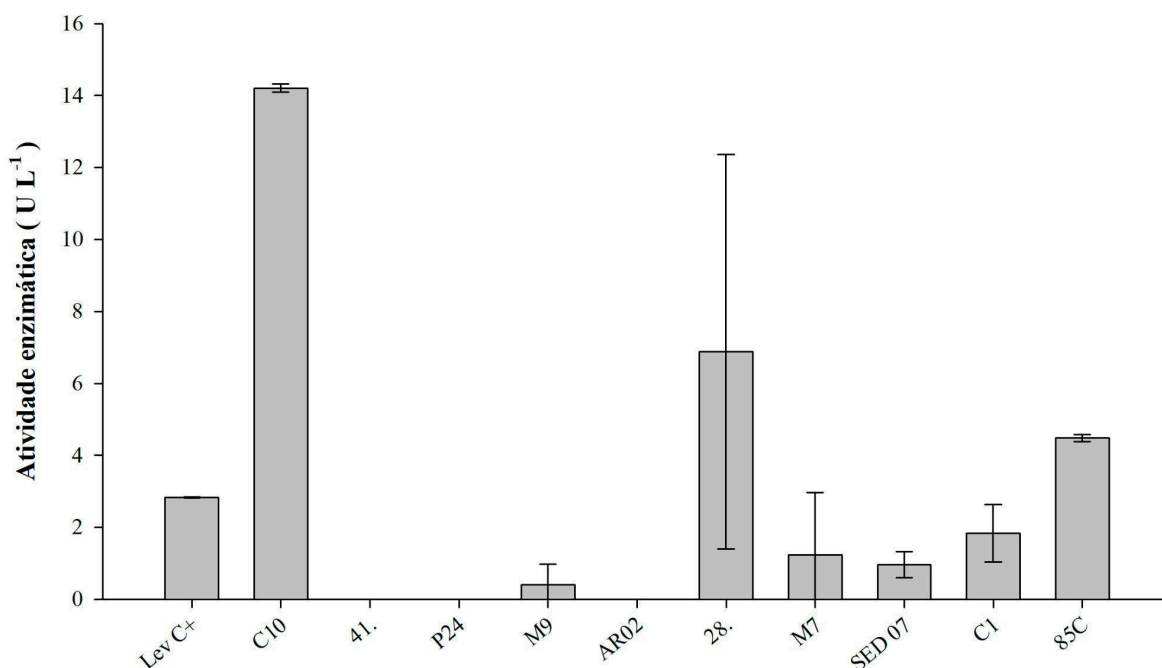


Figura 7. Atividade enzimática (U L⁻¹) das bactérias selecionadas cultivadas por 96h a 28 °C, sob agitação contínua de 140 rpm na presença de azeite de oliva.



Figura 8. Cubetas contendo extratos enzimáticos de diferentes bactérias. À esquerda extrato enzimático e substrato da bactéria 41 e à direita extrato enzimático e substrato da bactéria C10.

Além das cromatografias dos tratamentos de biodegradação do petróleo bruto, foram feitas cromatografias dos padrões para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (EPA 610 *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix*, CRM 48743, Sigma Aldrich) e para os alcanos C8-C40 (C8-C40 *Alkanes Calibration Standard*, 40147, Sigma Aldrich) (Figura 9). Deste modo pode-se identificar por comparação com os cromatogramas dos tratamentos elaborados

com os isolados bacterianos e fúngicos as moléculas de interesse contidos no petróleo bruto e seus respectivos tempos de retenção.

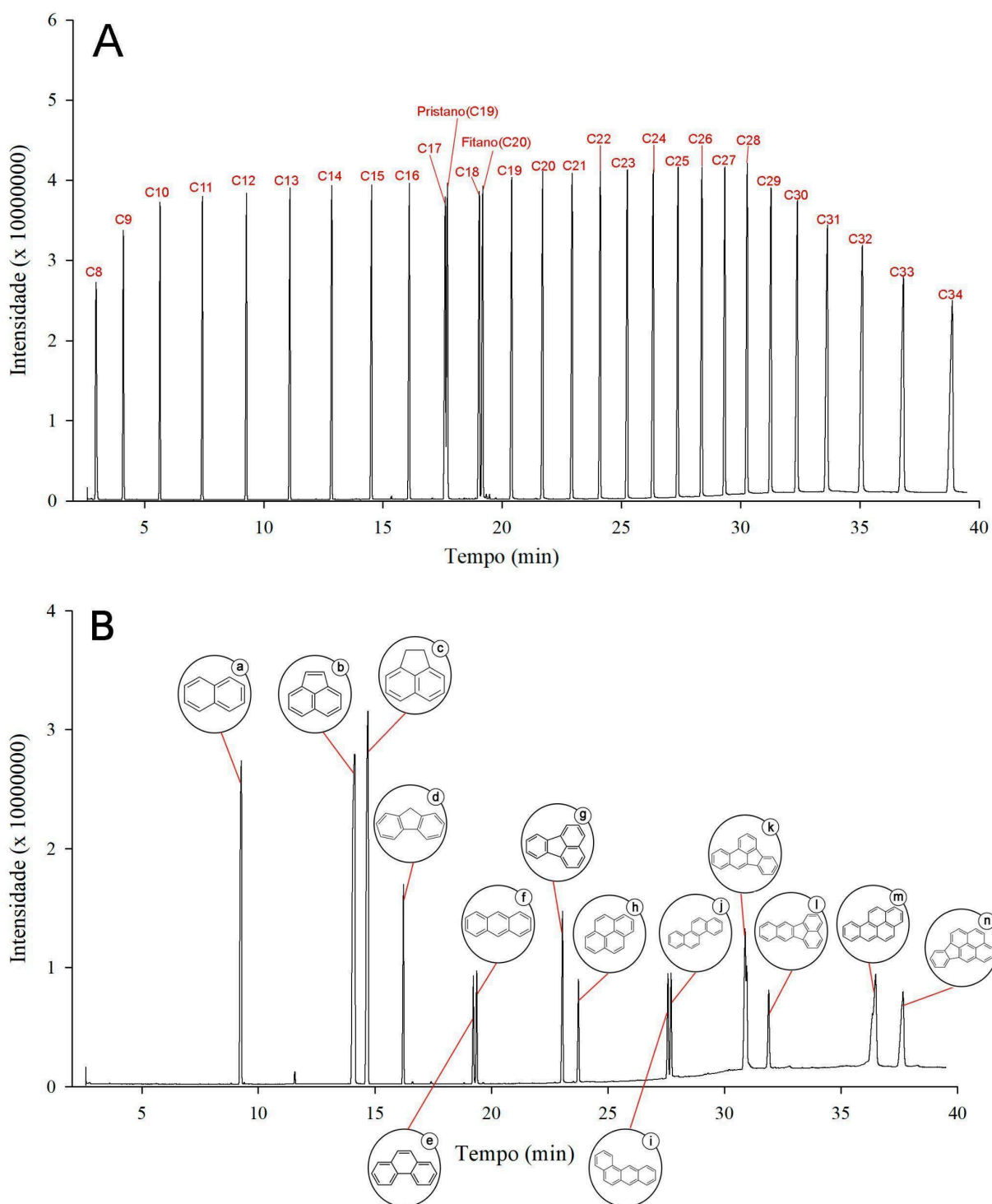
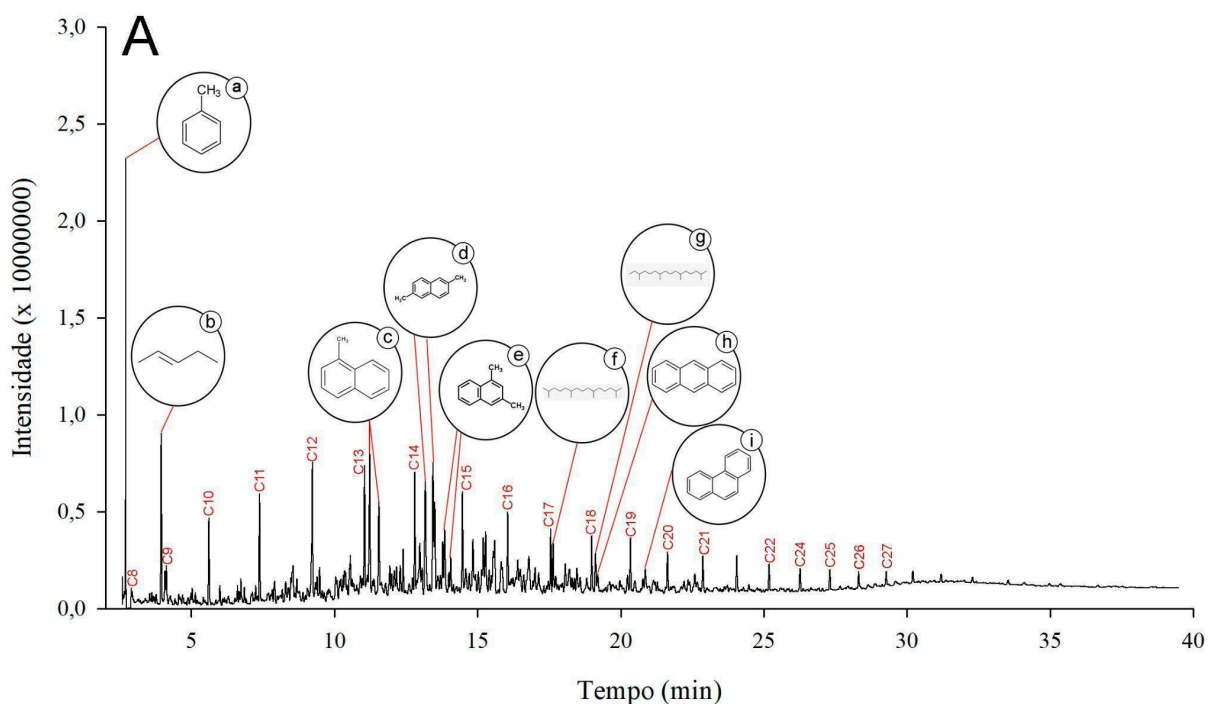


Figura 9. Cromatogramas dos padrões utilizados para verificar os tempos de retenção das moléculas de interesse. C8-C40 *Alkanes Calibration Standard* (A) e EPA 610 *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix* (B). (a) Naftaleno; (b) Acenaftileno; (c) Acenafteno; (d) Fluoreno; (e) Fenantreno; (f) Antraceno; (g) Fluoranteno; (h) Pireno; (i) Benz[a]antraceno; (j) Criseno; (k) Benz[a]fluoranteno; (l) Benz[k]fluoranteno; (m) Benz[a]pireno; (n) Indeno[1,2,3-cd]pireno.

A análise da degradação dos compostos presentes no petróleo neste estudo baseou-se na diminuição dos picos dos hidrocarbonetos. Durante a metabolização por microorganismos, os hidrocarbonetos alifáticos de cadeias médias e longas podem ser quebrados em compostos menores, resultando em altas concentrações de moléculas de cadeia curta no início do tempo de retenção. O mesmo ocorre com os HPAs, que podem ser reduzidos a compostos monoaromáticos como o tolueno, aumentando a intensidade dos picos de retenção correspondentes. Mesmo que o microrganismo consiga degradar hidrocarbonetos de cadeia curta sua efetividade na degradação ficará omitida pelo aumento da concentração destas moléculas advindas da clivagem de hidrocarbonetos de cadeias maiores. Entretanto, no presente estudo, qualquer aumento no pico de um hidrocarboneto quando comparado ao respectivo controle negativo, será inferido que o microrganismo não exibiu degradação para este hidrocarboneto.

No controle negativo utilizado para a avaliação da degradação do petróleo bruto pelos fungos, foi notada uma baixa intensidade de compostos nos tempos iniciais de retenção quando comparado ao controle negativo das bactérias (Figura 10). Isto pode ser devido a diferença de metodologia utilizada na preparação dos meios de cultivo. Para os fungos, foram esterilizados meios contendo MM1 e petróleo bruto 2%. Enquanto para as bactérias, foi esterilizado o petróleo bruto, separadamente do meio de cultivo.



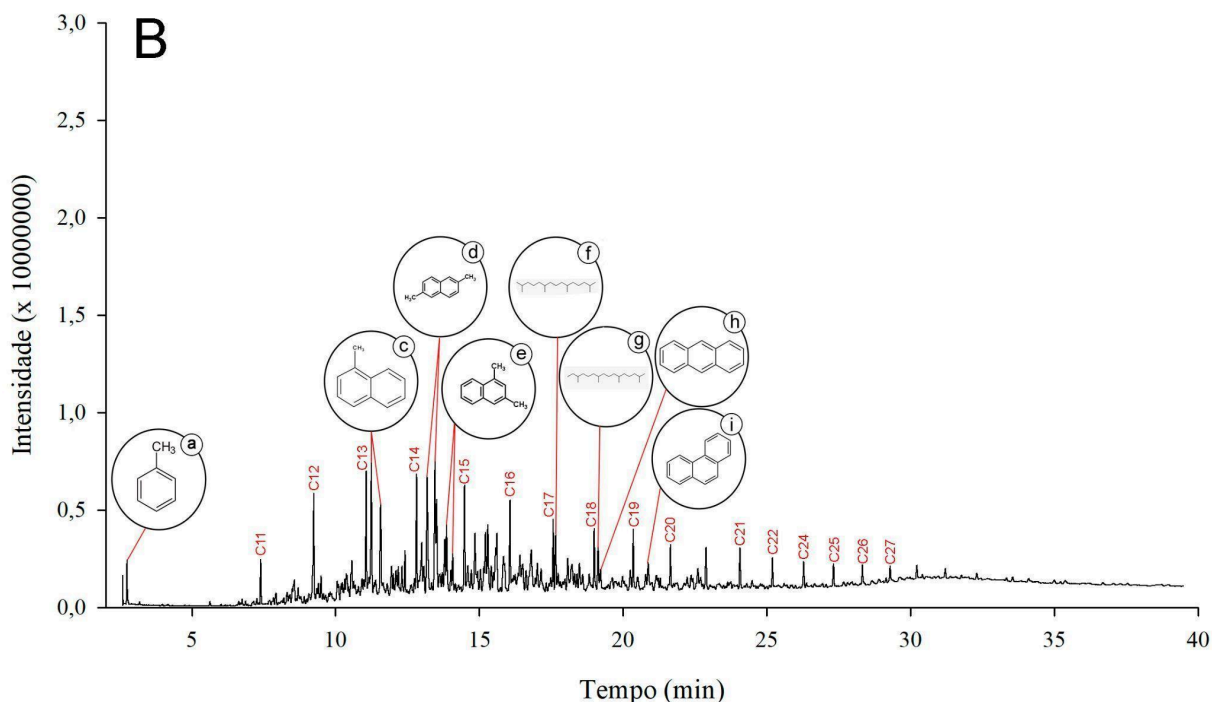


Figura 10. Cromatograma dos controles negativos, com os respectivos meios acrescidos de petróleo bruto. Experimentos com as bactérias (A) e experimentos com os fungos (B). (a) Tolueno; (b) 2-Penteno; (c) 1-Metil-Naftaleno; (d) 2,6-Dimetil-Naftaleno; (e) 1,3-Dimetil-Naftaleno; (f) Pristano; (g) Fitano; (h) Antraceno; (i) Fenantreno.

A bactéria *Acinetobacter beijerinckii* (28.) demonstrou alta degradação nos picos dos alifáticos (*e.g* C10-C27) (Figura 11. A). Entretanto, não demonstrou degradação de octano, 2-penteno e nonano. Quanto aos HPAs e monoaromáticos, apresentou degradação de antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e isômeros de dimetil-naftaleno, não exibindo degradação de tolueno. Esta bactéria tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos de cadeias médias (Huang *et al.*, 2013), evidenciado nos resultados obtidos. Além disso, foi observada a degradação de hidrocarbonetos alcanos de cadeias longas (*e.g* C20-C27). Bactérias do gênero *Acinetobacter* têm a preferência de degradação em hidrocarbonetos de cadeias longas, especialmente os hexadecanos (Acer *et al.*, 2016), característica que foi observada no presente estudo.

O isolado *Shingobium xenophagum* (41.) apresentou as maiores degradações de hidrocarbonetos no presente estudo. Houve degradação de hidrocarbonetos alifáticos (*e.g* C8, C10-C27) (Figura 11. B). Entretanto, não demonstrou degradação de C5 e C9. Quanto aos HPAs e monoaromáticos, degradou antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e os isômeros de dimetil-naftaleno, não exibindo degradação de tolueno. Estudos mostram a alta capacidade de

S. xenophagum de metabolizar fenantreno, utilizando proteínas dioxigenases que atuam na clivagem do anel aromático deste composto e direcionando para outras rotas metabólicas energéticas (Chen *et al.*, 2023; Dong *et al.*, 2014; Gran-Scheuch *et al.*, 2017). Também, nota-se a capacidade do gênero *Shingobium* de degradar compostos monoaromáticos e HPAs de até cinco anéis aromáticos (Kertesz; Kawasaki, 2010).

A bactéria *Microbacterium oleivorans* (M9) demonstrou capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos (*e.g* C5, C8, C10-C27) (Figura 11. C). Entretanto, não demonstrou degradação de C9. Quanto aos HPAs, exibiu degradação de antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e os isômeros de dimetil-naftaleno. Notavelmente houve uma alta degradação do tolueno. Estudos apontam que o gênero *Microbacterium* possui uma alta capacidade de degradação de antraceno (Salam; Obayori; Olatoye, 2014), entretanto, no presente trabalho não foi observada esta intensa degradação. Espécies relatadas do gênero *Microbacterium* possuem uma alta capacidade de utilizar tolueno em suas vias metabólicas e crescerem em meio contendo os compostos BTEX (Kye-Heon; Hyung-Yeel, 2005; Wongbunmak *et al.*, 2017).

A bactéria *Shewanella haliotis* (C10) degradou alifáticos (*e.g* C8-C27) (Figura 11. D), entretanto, não foi capaz de degradar 2-penteno. Quanto aos HPAs, degradou o antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e os isômeros de dimetil-naftaleno. Notavelmente houve alta degradação do tolueno e foi a melhor degradadora de octano, nonano e alguns picos de decanos. Estudos prévios apontam que *S. haliotis* tem a capacidade de degradar petróleo bruto, incluindo os HPAs e tem alta tolerância à salinidade (Bayat; Hassanshahian; Hesni, 2015; Gg; Oh, 2016)

A bactéria *Acinetobacter* sp. (SED 07) degradou alifáticos (*e.g* C8, C10-C27) (Figura 11. E). Não foi capaz de degradar 2-penteno e nonano. Apresentou maior degradação dos alcanos C10-C16, como também evidenciado no estudo de Acer *et al.* (2016). Quanto aos HPAs, exibiu alta degradação de antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e dos isômeros de dimetil-naftaleno. Notavelmente este isolado foi o melhor degradador de tolueno no presente estudo. Uma variedade de espécies e linhagens de *Acinetobacter* possuem a alta capacidade de degradar tolueno, benzeno e etilbenzeno (Kim; Jeon, 2009; Singh, P. *et al.* 2018).

A bactéria *Pseudomonas* sp. (P24) demonstrou baixa degradação de alifáticos (*e.g* C8, C12-C26) (Figura 11. F). Não foi capaz de degradar C9, C10, C11 e C27. Quanto aos HPAs, exibiu baixa degradação de antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e dos isômeros de dimetil-naftaleno. Houve degradação do tolueno.

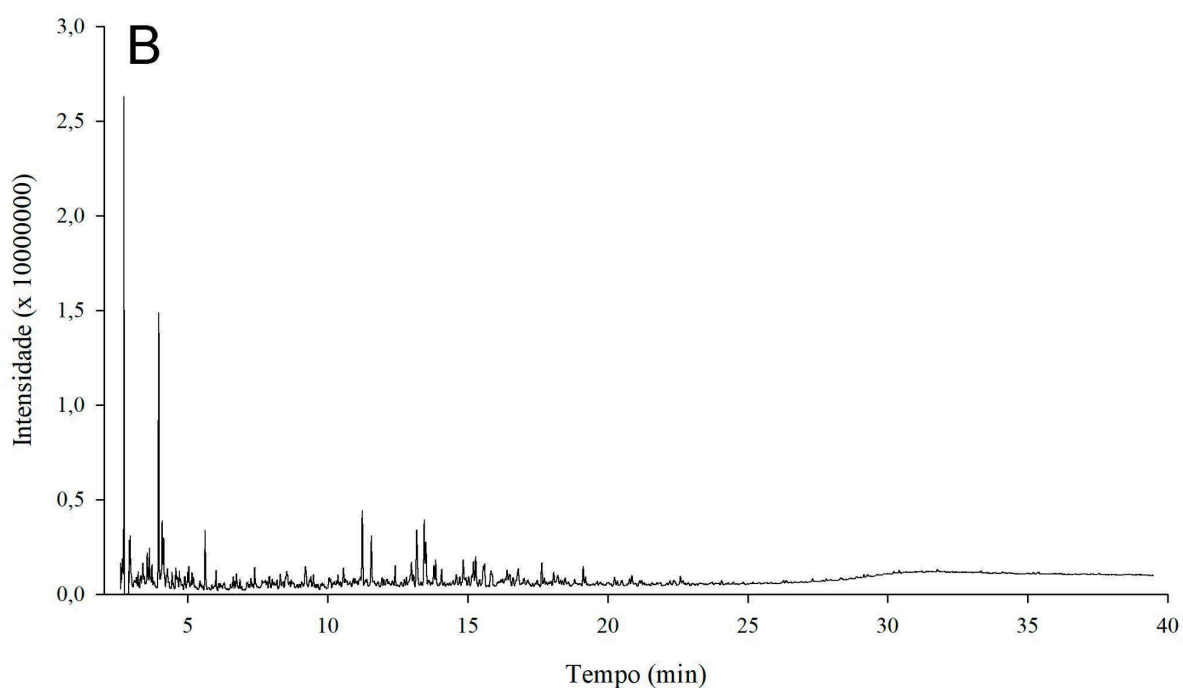
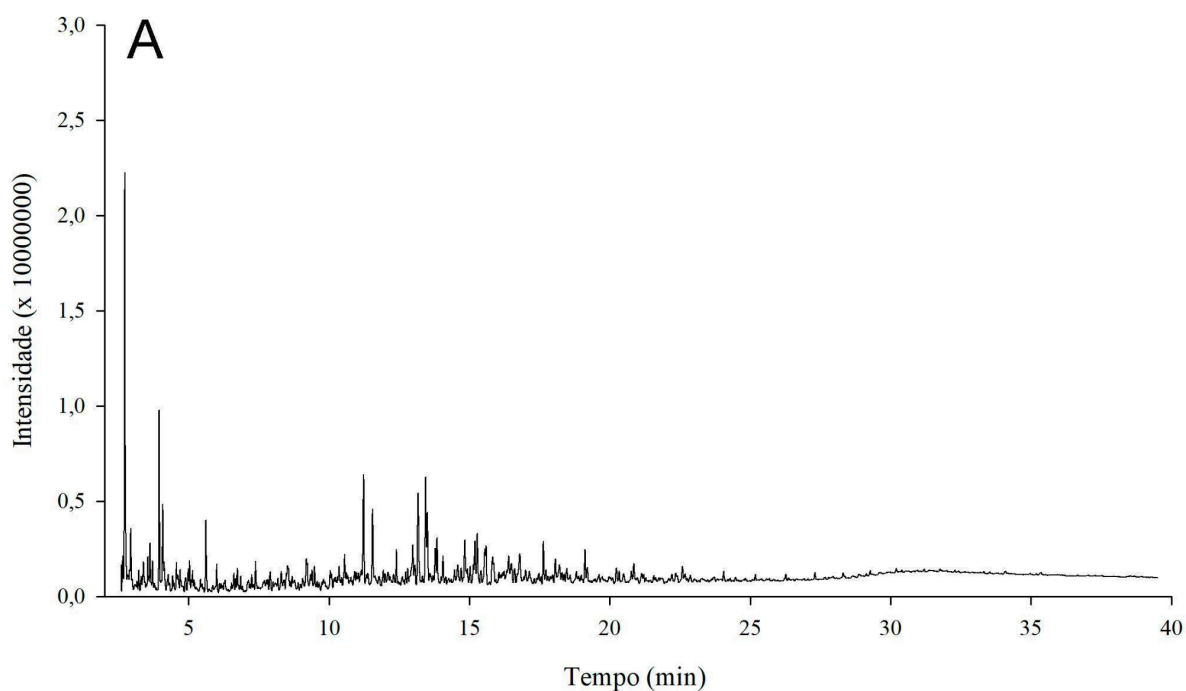
A bactéria *Zhihengliuella* sp. (M7) demonstrou uma baixa degradação de alifáticos (e.g C8, C10-C13, C14-C22) (Figura 11. G) . Não foi capaz de degradar C5, C9 e C24-C26. Quanto aos HPAs, também exibiu baixa degradação de antraceno e 1,3-dimetil-naftaleno. Não foi capaz de degradar tolueno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e outros isômeros de dimetil-naftaleno.

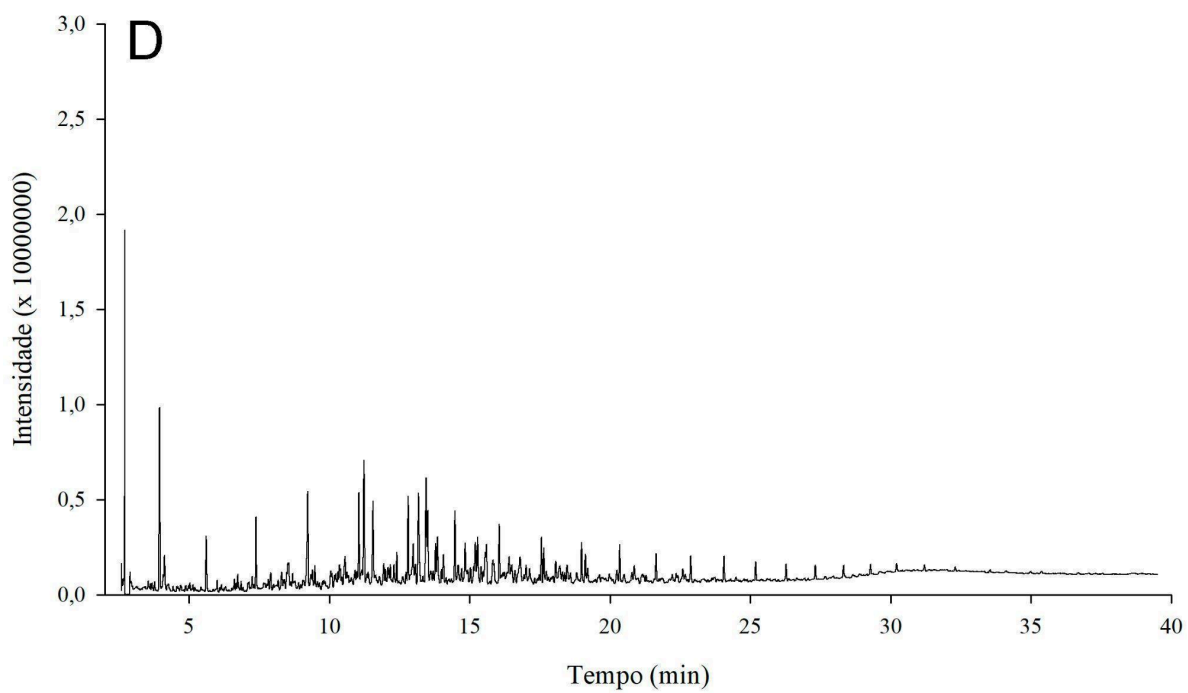
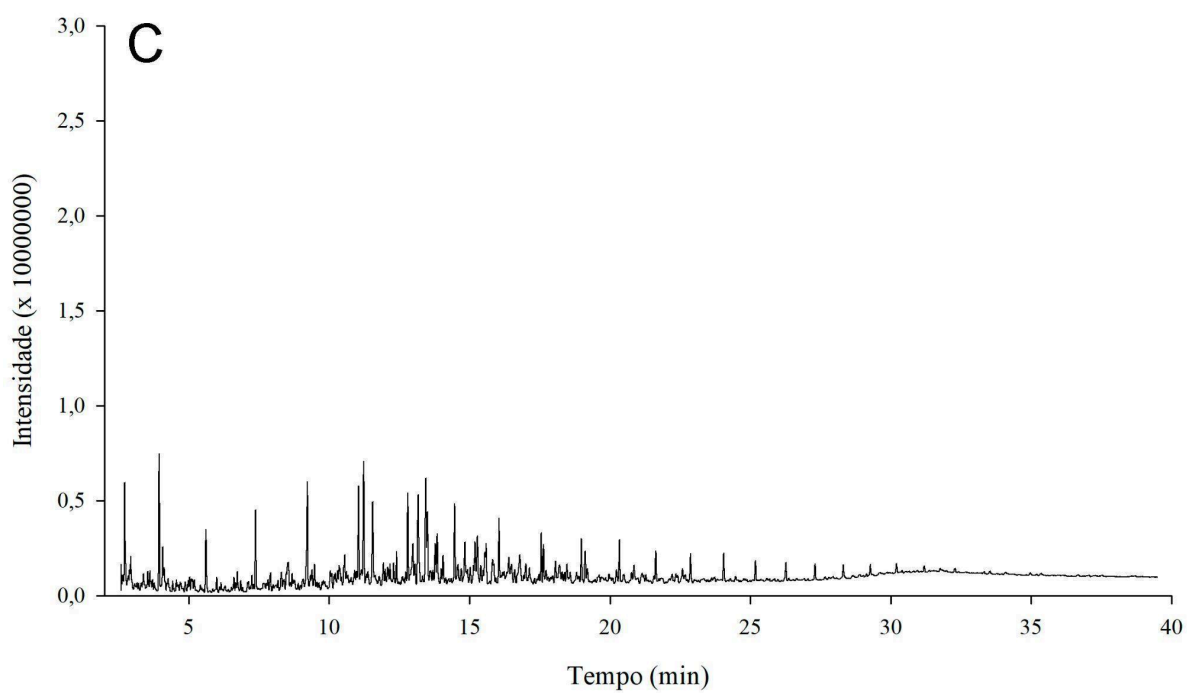
A bactéria *Brucella intermedia* (C1) demonstrou baixa degradação de alifáticos (e.g C12-C24) (Figura 11. H). Não foi capaz de degradar C8-C11 e C25-C27. Quanto aos HPAs, houve baixa degradação de antraceno, fenantreno e isômeros de dimetil-naftaleno. Foi capaz de degradar o tolueno. Estudos anteriores apontam que bactérias do gênero *Brucella* podem degradar compostos do petróleo bruto, incluindo HPAs (Feng *et al.*, 2023). Especificamente, atuam degradando compostos contendo benzenos em sua composição, transformando-os em compostos alifáticos. No contexto de um consórcio de microrganismos para a degradação de petróleo bruto, essa bactéria atua degradando e disponibilizando estes compostos alifáticos para outros tipos de microrganismos, facilitando sua degradação (Muthukumar, 2003; Zhao *et al.*, 2011). Possivelmente, o aumento da intensidade de compostos como o nonano e decano (alifáticos) pode ser devido a transformação de compostos contendo benzeno em sua composição, especialmente o tolueno, que foi observado uma diminuição em seu pico.

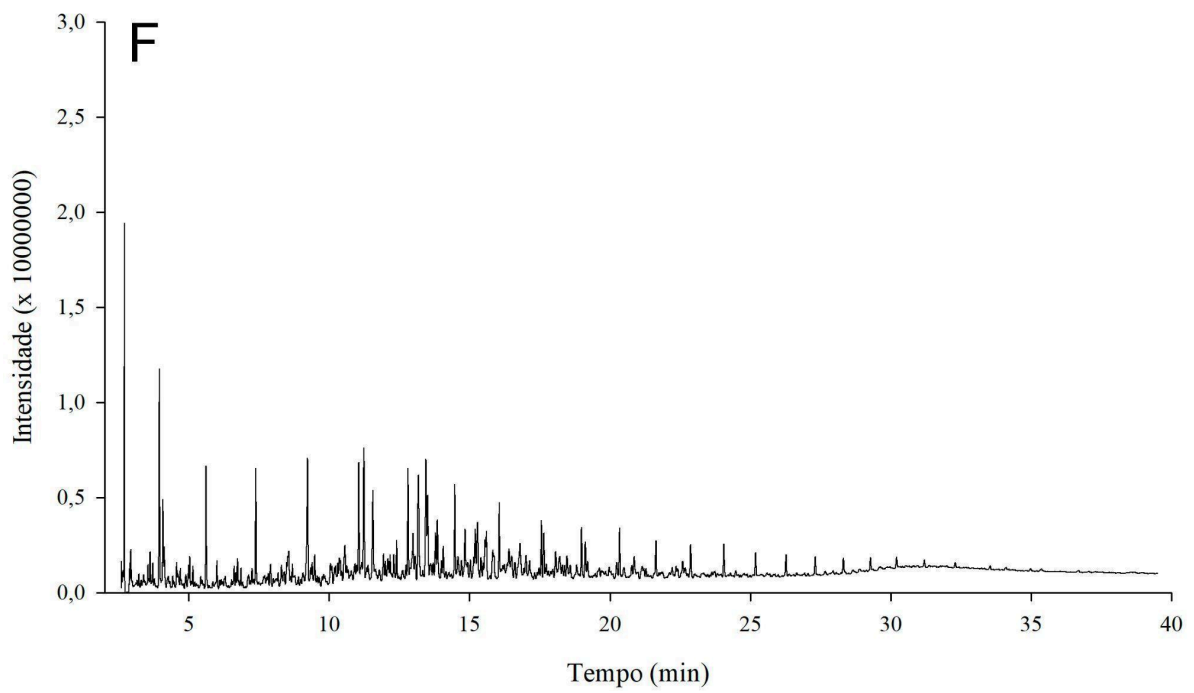
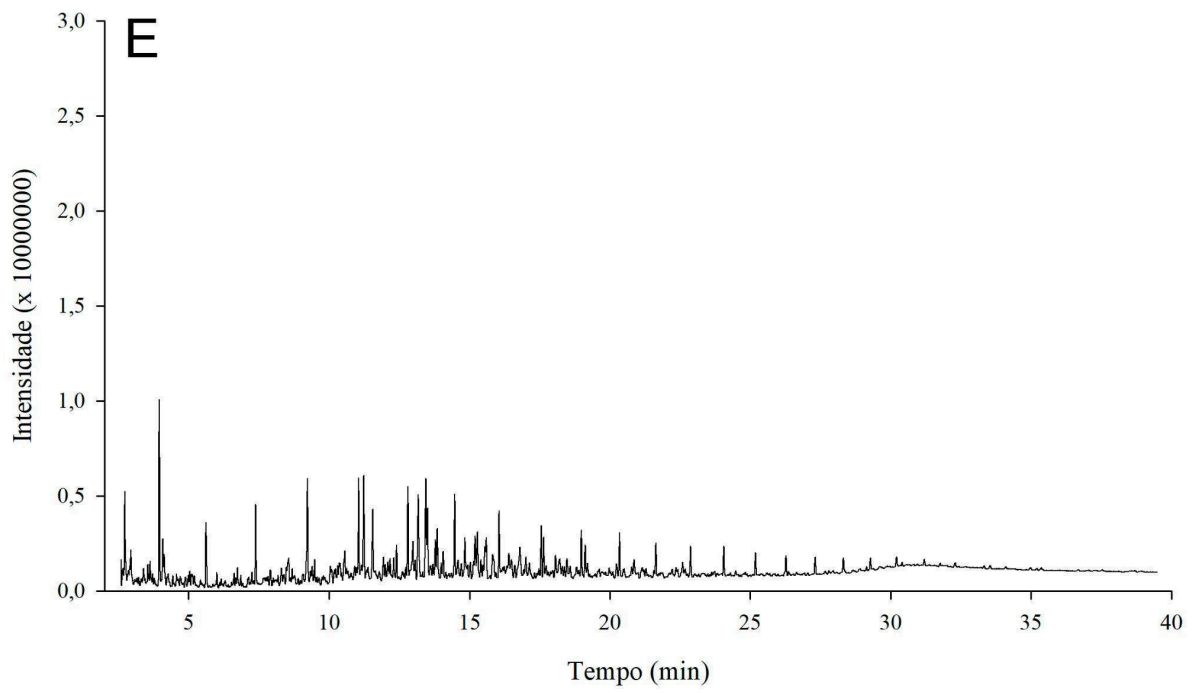
A bactéria *Stutzerimonas balearica* (AR02) demonstrou degradação de alifáticos (e.g C8, C9, C11-C27) (Figura 11. I). Não foi capaz de degradar 2-penteno e decano. Quanto aos HPAs, degradou antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno, isômeros de dimetil-naftaleno. Entretanto, não foi capaz de degradar o tolueno. Estudos prévios apontam que esta bactéria, anteriormente denominada *Pseudomonas balearica* (Lalucat *et al.*, 2022), tem a capacidade de degradar diversos HPAs, como: naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno, fenotiazina e pireno (Salvà-Serra *et al.*, 2023; Yetti *et al.*, 2015).

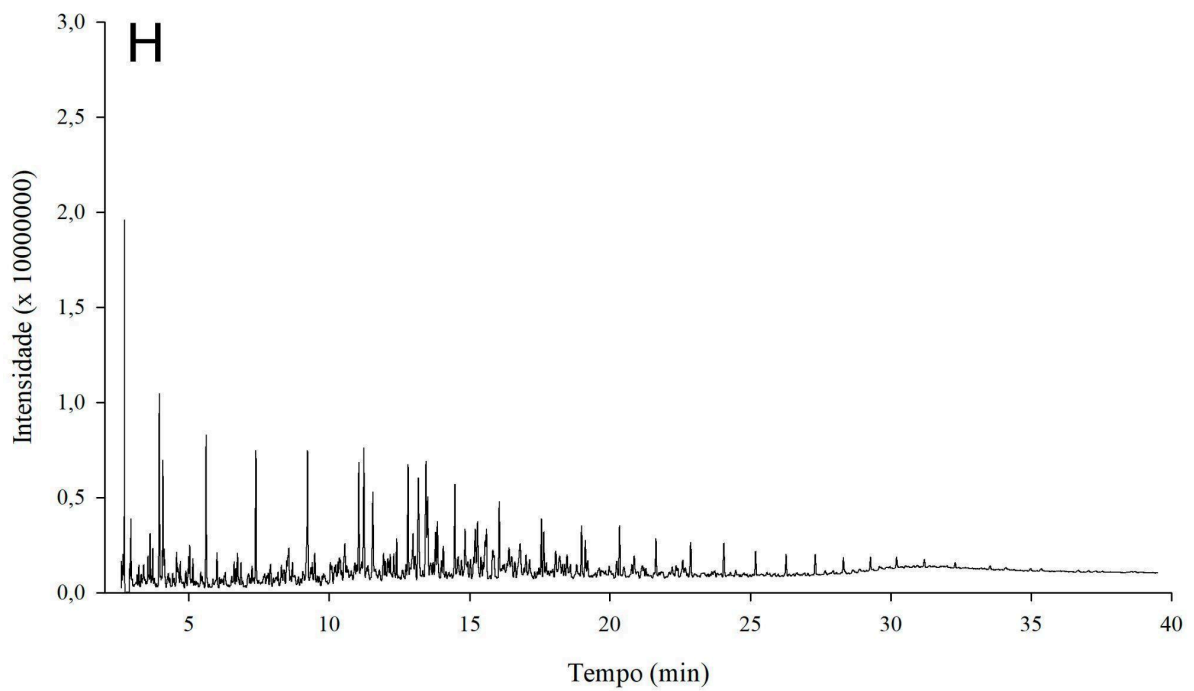
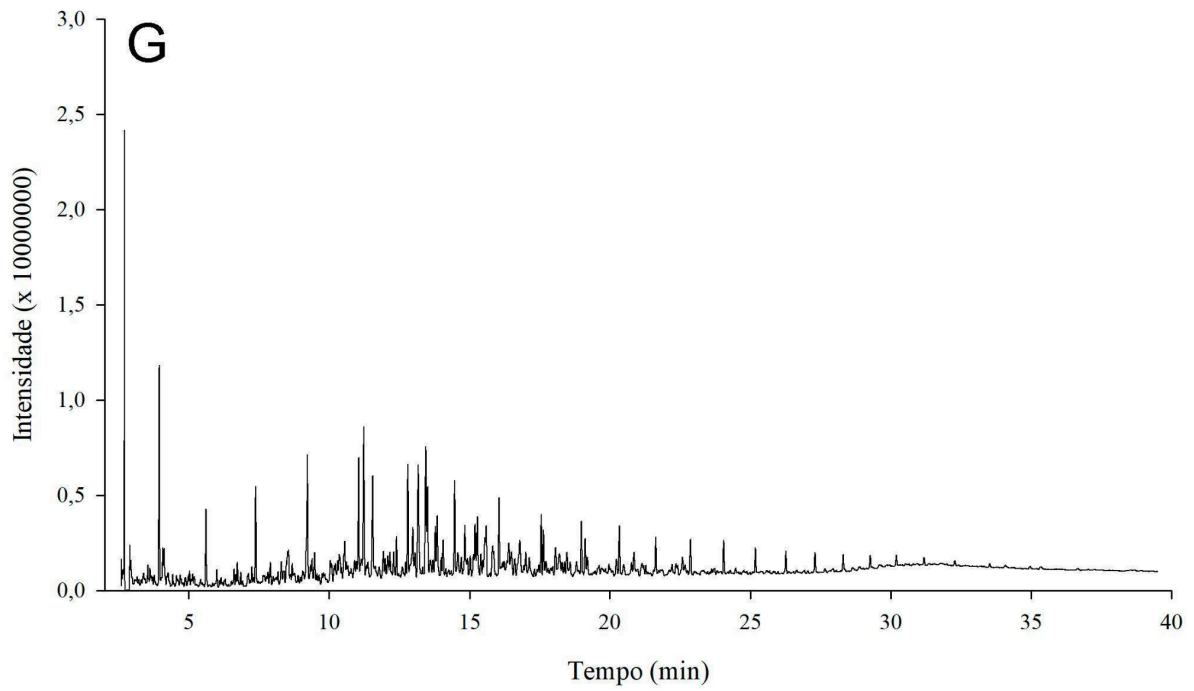
A bactéria *Alcanivorax* sp. (85C) demonstrou degradação de alifáticos (e.g C5, C8, C9, C12-C27) (Figura 11. J), notavelmente o 2-penteno, sendo a bactéria que melhor degradou esta molécula. Entretanto, não foi capaz de degradar C10 e C11. Quanto aos HPAs, degradou antraceno, fenantreno, 1-metil-naftaleno e isômeros de dimetil-naftaleno. Entretanto, não foi capaz de degradar o tolueno. Na literatura há relatos da capacidade de *Alcanivorax* degradar hidrocarbonetos de cadeias curtas (C5-C11), médias (C12-C18) e cadeias longas (C19-C30) (Santisi *et al.*, 2015; Zadjelovic *et al.*, 2020). Análises genômicas deste gênero apontam a capacidade desta ampla degradação a genes do citocromo P450 envolvidos na metabolização de alcanos de cadeia curtas (C5-C11) e três homólogos da alcano monooxigenase *alkB* que catalisam a primeira etapa da hidroxilação de alcanos C10-C20. Também, enzimas

monooxigenase de ligação à flavina (*AlmA*) possibilitam a metabolização de alcanos acima de 20 carbonos em sua cadeia principal e membranas transportadoras de alcanos *fadL* auxiliam no transporte destas moléculas (Zadjelovic *et al.* 2020). No presente estudo, o isolado *Alcanivorax* sp. (85C) não apresentou altas degradações, apenas em algumas cadeias curtas como 2-penteno (C5) e octano (C8).









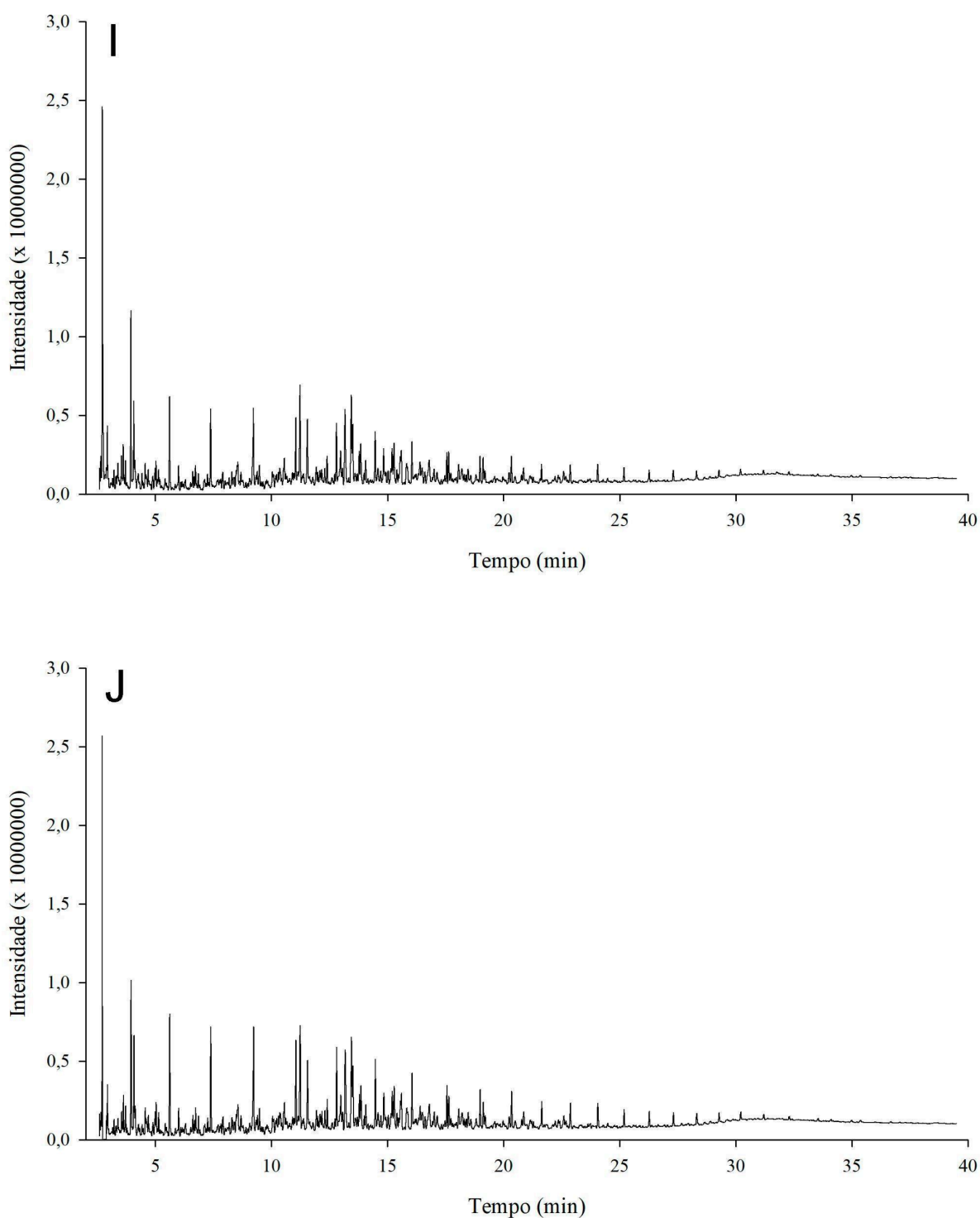


Figura 11. Cromatogramas da degradação do petróleo bruto testando os isolados bacterianos. *Acinetobacter beijerinckii* (28.) (A), *Sphingobium xenophagum* (41.) (B), *Microbacterium oleivorans* (M9) (C), *Shewanella haliotis* (C10) (D), *Acinetobacter* sp. (SED07) (E), *Pseudomonas* sp. (P24) (F), *Zhihengliuella* sp. (M7) (G), *Brucella intermedia* (C1) (H), *Stutzerimonas balearica* (AR02) (I), *Alcanivorax* sp. (85C) (J).

O isolado *Mucor racemosus* (CRM 336) apresentou a capacidade de degradar todos os alifáticos analisados, entretanto, em baixos níveis de degradação (Figura 12. A). Quanto aos HPAs, este isolado foi capaz de degradar 1-metil-naftaleno, isômeros de dimetil-naftaleno, antraceno e fenantreno. Resultados obtidos por Nrior e Jirigwa (2017) demonstram que *Mucor racemosus* conseguiu degradar 13,07% do total de hidrocarbonetos superficiais após 28 dias de cultivo. O gênero *Mucor* possui a capacidade de degradar HPAs (Maamar *et al.*, 2020). Resultados obtidos por Passarini *et al.* (2011) demonstram a capacidade de *Mucor racemosus* CBMAI 847 (=CRM 336) em degradar pireno e benzo[a]pireno.

O isolado *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) demonstrou capacidade em degradar todos os alifáticos analisados, com reduções dos respectivos picos (Figura 12. B). Quanto aos HPAs, este isolado degradou os isômeros de 1-metil-naftaleno, isômeros de dimetil-naftaleno, antraceno e fenantreno. É relatado que o *Aspergillus sclerotiorum* possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos e HPAs (Maamar *et al.*, 2020; Passarini *et al.*, 2011). Estudos realizados por Giovanella *et al.* (2023) demonstram que o consórcio em condições de microcosmos de *Aspergillus sclerotiorum* CRM 348 e *Cryptococcus laurentii* CRM 707 foram capazes de degradar após 120 dias de 72 a 92% de alcanos de cadeia curta (C12 a C19) e de 90 a 92% alcanos de cadeia longa (C20 a C24), assim como, 48% de remoção de benzo[a]pireno. Outras espécies do gênero *Aspergillus* também possuem a capacidade de degradação de petróleo bruto (Al-Dossary; Abood; Al-Saad, 2019; Simister *et al.*, 2015). Estudos realizados por Alharbi *et al.* (2022) demonstram que *Aspergillus terreus* KC462061 produz lacase quando submetido ao meio contendo petróleo bruto, assim como, evidenciou o potencial desta enzima na degradação dos componentes alifáticos e HPAs do petróleo. Resultados obtidos por Bonugli-Santos *et al.* (2010a) demonstram que *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 (=CRM 348) produz lacase em pequenas quantidades quando submetido a diferentes concentrações de farelo de trigo e salinidade. Paralelamente, enzimas como a lacase podem ter sido produzidas por *A. sclerotiorum* CRM 348 no presente estudo e influenciado na degradação de petróleo bruto.

O isolado *Cladosporium cladosporioides* (CRM 354) degradou todos os alifáticos analisados (Figura 12. C). Entretanto, houve baixa degradação de HPAs. De acordo com a literatura, esta espécie tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos (Maamar *et al.*, 2020). No estudo realizado por Abdulrahman *et al.* (2023) diferentes isolados de *Cladosporium cladosporioides*, degradaram de 30,9% a 76,06%. Resultados obtidos por Birolli *et al.* (2018) demonstra que *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 1237 (= CRM 354) é capaz de degradar fenantreno (26,4 %) e pireno (18.8 %). No presente estudo, o

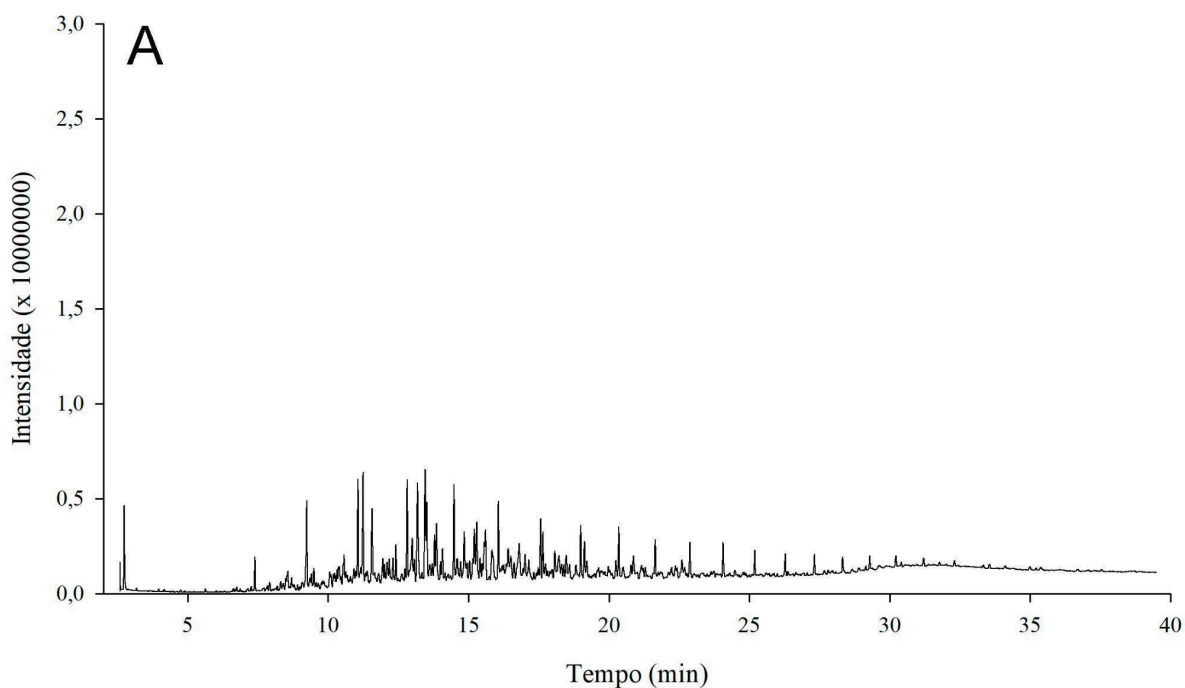
isolado CRM 354 degradou os hidrocarbonetos analisados, exceto o tolueno. Entretanto, visualmente, todos apresentaram poucas reduções em seus picos.

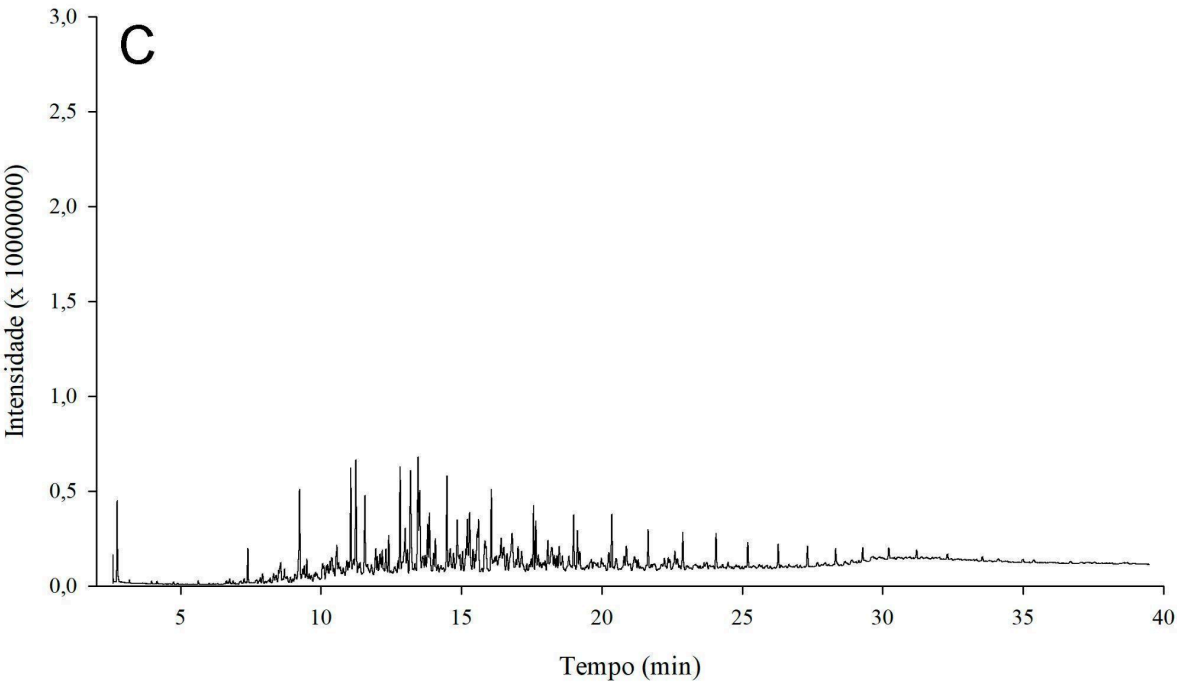
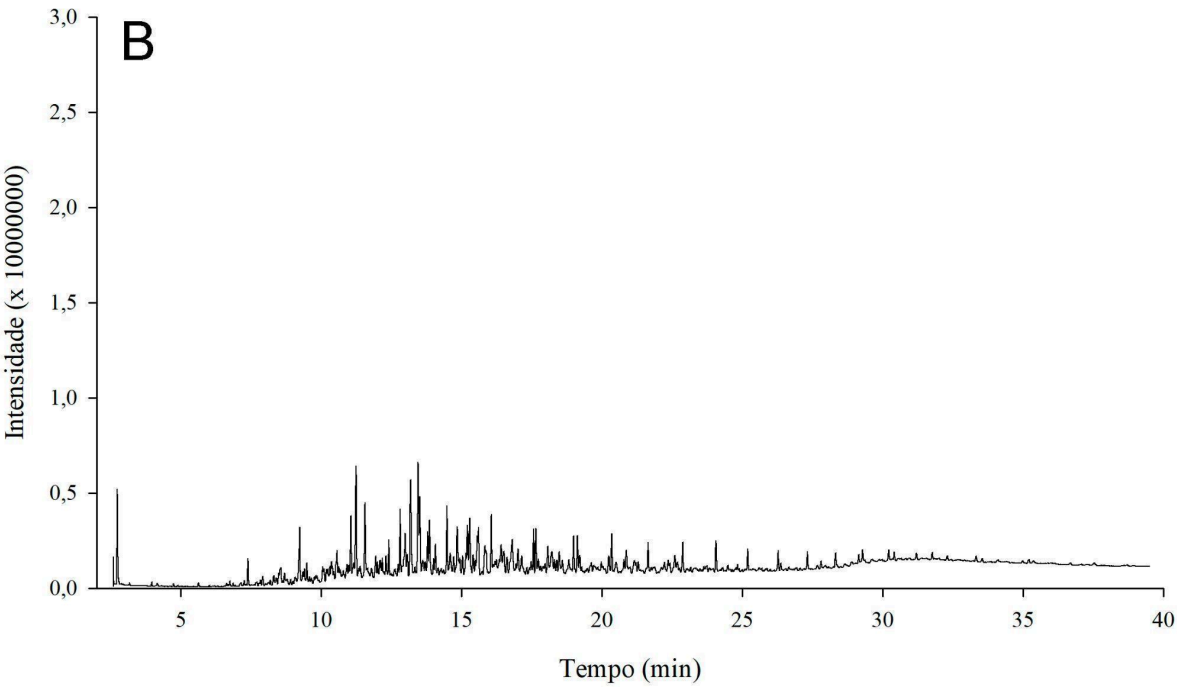
O isolado *Trichoderma harzianum* (CRM 470) degradou todos os alifáticos analisados (Figura 12. D). Quanto aos HPAs, degradou os isômeros de 1-metil-naftaleno, isômeros de dimetil-naftaleno, antraceno e fenantreno. Estudos feitos por Zafra e Cortés-Espinosa (2015) apontam que *T. harzianum* tem a capacidade de degradar petróleo bruto (40%), assim como, antraceno e pireno contidos no petróleo. Também, nota-se que o gênero *Trichoderma* possui a capacidade de degradar petróleo bruto e misturas contendo HPAs em uma variedade de espécies (Daccò *et al.*, 2020; Zafra; Cortés-Espinosa, 2015).

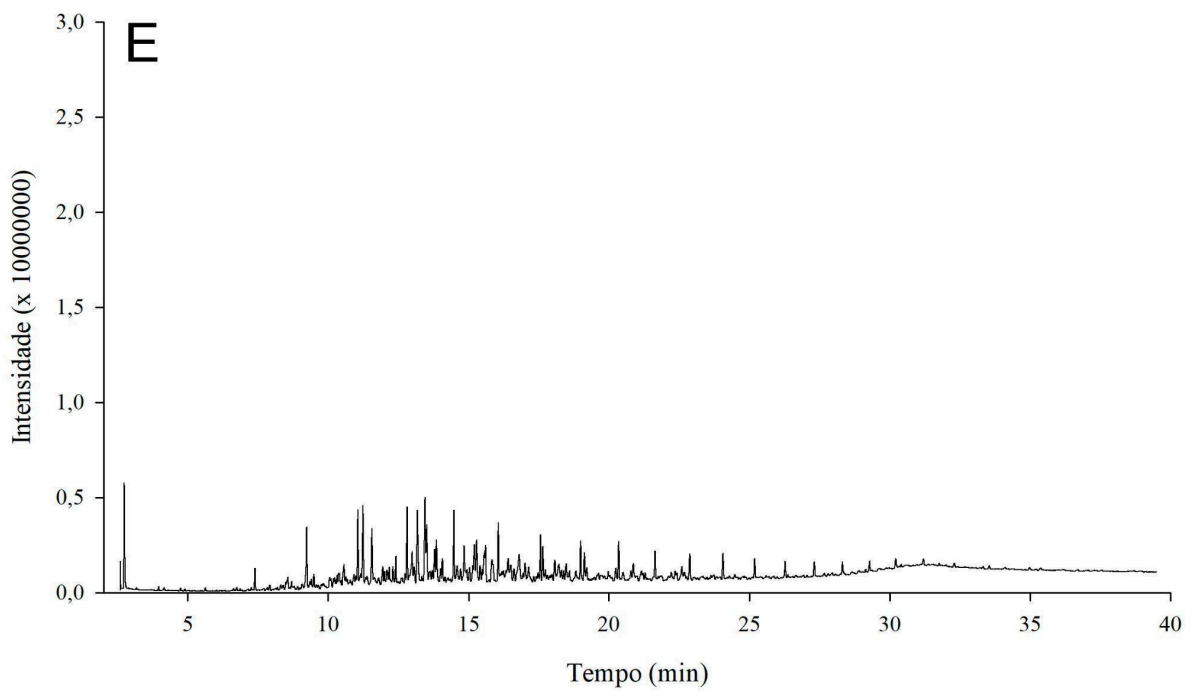
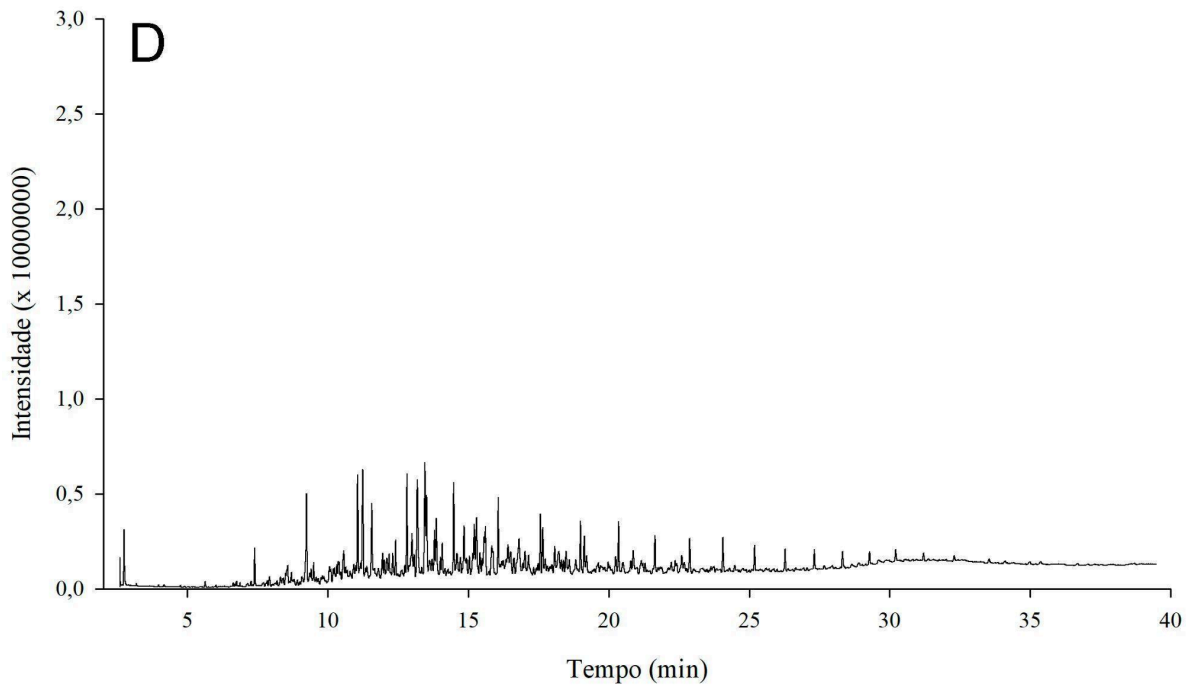
O isolado *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593) degradou todos os alifáticos analisados (Figura 12. E). Também degradou os isômeros de 1-metil-naftaleno, isômeros de dimetil-naftaleno, antraceno e fenantreno. Comparando com os demais fungos analisados, este isolado apresentou, visualmente, as maiores reduções nos picos dos alcanos e HPAs. Resultados obtidos por Vieira *et al.* (2018) indicam que *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (= *P. palmivorus* CRM 593) possui a capacidade de degradação de pireno e benzo[a]pireno, ambos ultrapassando 90% de degradação após 7 dias. Estudos realizados por Effendi *et al.* (2021) indicam que a enzima lacase, produzida por *Marasmiellus palmivorus* (= *Paramarasmius palmivorus*), atua na degradação do petróleo bruto em conjunto com microrganismos nativos contidos na amostra de solo contaminada petróleo. Este autor obteve até 54,1% de redução dos hidrocarbonetos totais do petróleo contidos na amostra de solo. Resultados obtidos por Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2010b) demonstram a capacidade de *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (= *P. palmivorus* CRM 593) em produzir a enzima lacase, com valores de 971 U L⁻¹. Paralelamente, no presente estudo a lacase pode ter contribuído para a degradação de componentes contidos no petróleo. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo que submeta esta espécie à degradação de petróleo bruto diretamente.

O isolado *Tinctoporellus* sp. (CRM 592) degradou os alifáticos e HPAs (Figura 12. F). Em alguns picos do cromatograma houve um aumento da intensidade das moléculas analisadas, quando comparado ao controle negativo (Figura 10. B), notavelmente do tolueno e 2-penteno. Resultados obtidos por Vieira *et al.* (2018) revelam a capacidade de degradação de pireno e benzo[a]pireno por este isolado, ambos alcançando cerca de 50% de degradação após 21 dias. Resultados obtidos por estes autores corroboram com a degradação observada de naftaleno, fenantreno e antraceno no presente estudo. Cabe ressaltar que dados prévios de degradação de petróleo bruto pelo gênero *Tinctoporellus* são escassos.

O isolado *Peniophora* sp. (CRM 1241) degradou os alifáticos e HPAs analisados (Figura 12. G). Resultados obtidos por Vieira *et al.* (2018) revelam a capacidade de degradação de pireno e benzo[a]pireno por *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (= *Peniophora* sp. CRM 1241), ambos alcançando cerca de 30% de degradação após 21 dias. Nos estudos realizados por Lee *et al.* (2020) a degradação de HPAs (antraceno, fluoranteno, fenantreno e pireno) por 5 isolados de *Peniophora incarnata*, apresentou valores de 40 a 90% destes hidrocarbonetos. O mesmo autor indicou que enzimas como lacase, MnP (manganês peroxidase) e LiP (lignina peroxidase) atuaram na degradação dos HPAs, com as duas primeiras atuando inicialmente na degradação e LiP nos estágios finais.







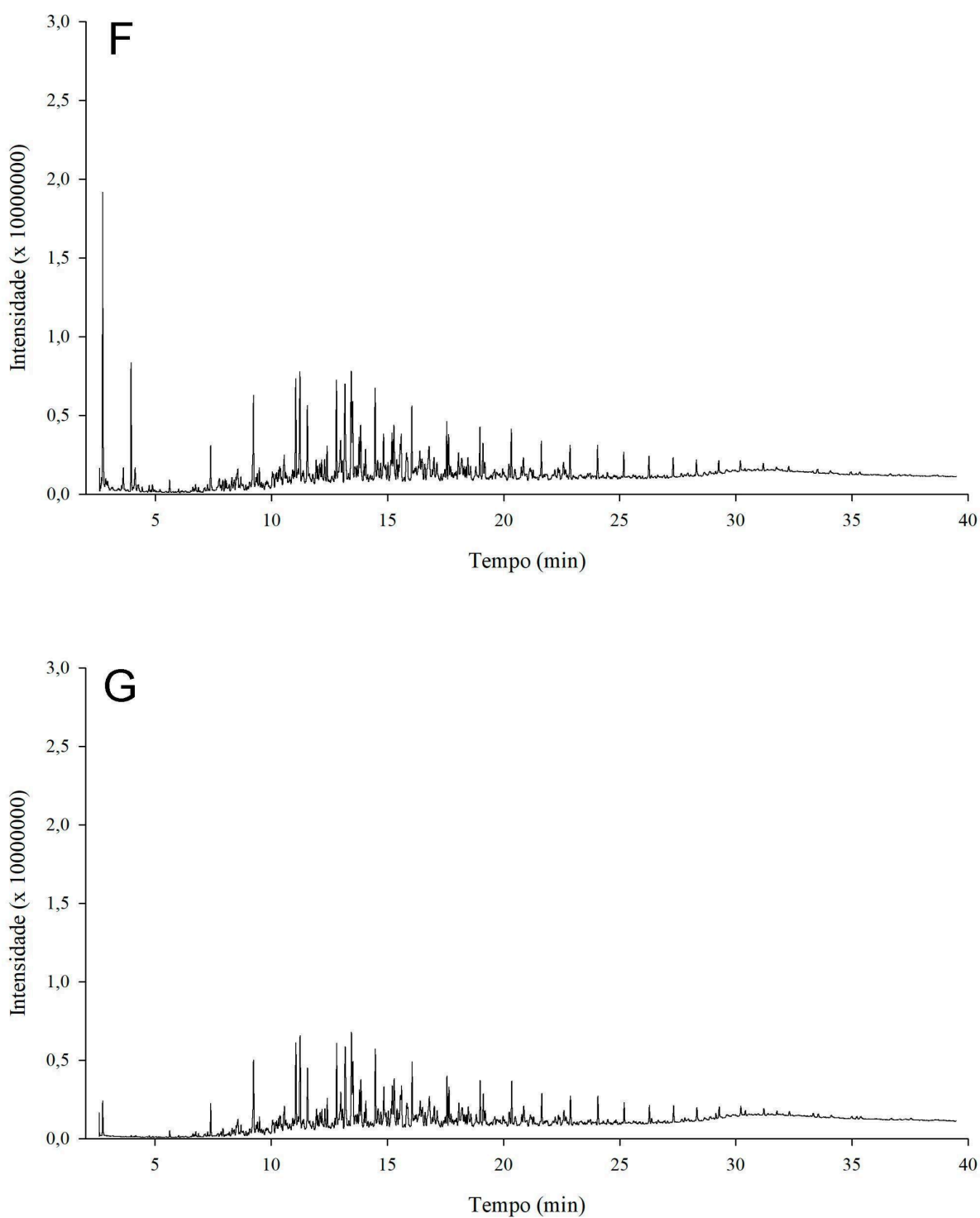


Figura 12. Cromatogramas da degradação do petróleo bruto testando os isolados fúngicos. *Mucor racemosus* (CRM 336) (A), *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) (B), *Cladosporium cladosporioides* (CRM 354) (C), *Trichoderma harzianum* (CRM 470) (D), *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593) (E), *Tinctoporellus* sp. (CRM 592) (F), *Peniophora* sp. (CRM 1241) (G).

Na seleção dos microrganismos para os consórcios, devem ser considerados três parâmetros abordados neste estudo: degradação do petróleo bruto, índice de emulsificação de diesel e atividade de lipase. Selecionar microrganismos de diferentes gêneros promove uma maior variabilidade genética ao consórcio. Consequentemente, isso gera uma redundância funcional, promovendo uma maior diversidade metabólica que pode atuar sinergicamente na degradação do petróleo bruto.

Com base nos resultados obtidos, os isolados *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593), *Sphingobium xenophagum* (41.) e *Acinetobacter beijerinckii* (28.) apresentaram as melhores degradações dos picos analisados de hidrocarbonetos contidos no petróleo bruto. Em adição, *Shewanella haliotis* (C10) e *Alcanivorax* sp. (85C) apresentaram as melhores atividades de lipase, enquanto *Alcanivorax* sp. (85C) e *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) foram os isolados que apresentaram os maiores índices de emulsificação de óleo diesel.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi proposto a avaliação do potencial metabólico de fungos e bactérias de origem marinha para a elaboração de um consórcio microbiano degradador de petróleo bruto como alternativa para a mitigação da problemática da contaminação ambiental deste poluente. Foram estudados 7 fungos filamentosos e 10 bactérias quanto ao crescimento em diferentes meios de cultivo, produção de lipase, emulsificação e degradação do petróleo bruto.

Foi evidenciada a degradação do petróleo bruto, notavelmente por: *Sphingobium xenophagum* (41.), *Acinetobacter beijerinckii* (28.) e *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593). Ademais, foi demonstrado microrganismos capazes de produzir lipases e/ou biossurfactantes emulsificadores que atuassem neste contexto de biorremediação: *Shewanella haliotis* (C10), *Alcanivorax* sp. (85C) e *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348).

Os conhecimentos obtidos neste trabalho podem ser utilizados como base para novas pesquisas que ampliem a aplicabilidade do uso destes microrganismos em escalas maiores e a utilização destes em campo. Principalmente na remediação de ambientes marinhos contaminados com petróleo bruto, favorecendo a recuperação desses ecossistemas afetados. Assim como, promover o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que possam ser uma alternativa para a remediação química e física de áreas contaminadas.

No contexto do projeto MicroBioMar, pesquisas futuras serão realizadas utilizando o consórcio elaborado e/ou com os microrganismos selecionados no presente estudo, por meio de análises em escala de microcosmos e mesocosmos. Considerando os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que os microrganismos *Sphingobium xenophagum* (41.); *Acinetobacter beijerinckii* (28.); *Shewanella haliotis* (C10); *Alcanivorax* sp. (85C); *Paramarasmius palmivorus* (CRM 593) e *Aspergillus sclerotiorum* (CRM 348) sejam avaliados em consórcio, visando otimizar a degradação do petróleo bruto pela ação de diferentes mecanismos metabólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASIAN, F. *et al.* A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 670–699, jun. 2015.

ABUBAKAR, A. *et al.* Crude oil biodegradation potential of lipase produced by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hydrocarbon contaminated soil. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, [s. l.], v. 6, p. 26–32, 2024.

ABDULRAHMAN, M. S. *et al.* Assessment of the biodegradation potentiality of crude petroleum oil by *Cladosporium* species. **Department of Microbiology and Immunology (Al Azhar University)**, [s. l.], 2023.

ACER, Ö. *et al.* Isolation and characterization of long-chain alkane-degrading *Acinetobacter* sp. BT1A from oil-contaminated soil in Diyarbakır, in the Southeast of Turkey. **Bioremediation Journal**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 80–87, 2016.

AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 10, p. 3628–3634, 2010.

AL-DOSSARY, M. A.; ABOOD, S. A.; AL-SAAD, H. T. Biodegradation of crude oil using *Aspergillus* species. **Biodegradation**, v. 9, n. 4, 2019.

AL-HAWASH, A. B. *et al.* Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 71–76, jun. 2018.

ALHARBI, N. K. *et al.* Transcriptome Profiling Reveals Differential Gene Expression of Laccase Genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during Biodegradation of Crude Oil. **Biology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 564, 2022.

AMRAN, R. *et al.* Biodegradation and Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems by Microorganisms: A Review. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 21, n. 3, p. 1149–1157, 1 set. 2022.

ANANTHI, S. *et al.* Purification and Characterization of Lipase from *Shewanella* sp. CMST GISA-MSU Through Solid State Fermentation and Its Positional Specificity. **Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1842-1856, 2016.

ANANTHIVEL, S. *et al.* Optimization and purification of lipase through submerged fermentation by *Alcanivorax* sp. GI-CMST1 from the gut of marine fish *Sardinella longiceps*. **Der Pharma Chemica**, [s. l.], 2016.

ASIMOV, I; SHULMAN, J.A. Isaac Asimov's book of science and nature quotations. ed. Nova Iorque: Weidenfeld & Nicolson, 1988.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations

and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 180, nov. 2016.

BAO, M. *et al.* Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter sp.* D3-2 and its biodegradation of crude oil. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 897–903, 2014.

BAYAT, Z.; HASSANSHAHIAN, M.; HESNI, M. A. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 85–91, 2015.

BHANDARI, S. *et al.* Microbial Enzymes Used in Bioremediation. **Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2021, p. 1–17, 2021.

BIDJA ABENA, M. T. *et al.* Crude Oil Biodegradation by Newly Isolated Bacterial Strains and Their Consortium Under Soil Microcosm Experiment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1223–1244, dez. 2019.

BIROLI, W. G. *et al.* Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium sp.* CBMAI 1237. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 129, n. 2, p. 525–533, 2018.

BONUGLI-SANTOS, R. C. *et al.* Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 32–37, 2010a.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 114, n. 10, p. 863–872, 2010b.

CABRAL, L. *et al.* Microbial communities in petroleum-contaminated sites: Structure and metabolisms. **Chemosphere**, v. 286, p. 131752, jan. 2022.

CARMONA, M. *et al.* Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 1, p. 71–133, mar. 2009.

CARPENTER, A. Oil pollution in the North Sea: the impact of governance measures on oil pollution over several decades. **Hydrobiologia**, v. 845, n. 1, p. 109–127, nov. 2019.

CHEN, J. *et al.* Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter sp.* from petroleum-contaminated soil: Biosurfactant producers, optimization and its properties. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 660–671, 2012.

CHEN, R. *et al.* Microbial Consortium HJ-SH with Very High Degradation Efficiency of Phenanthrene. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2383, 2023.

DACCÒ, C. *et al.* *Trichoderma*: Evaluation of Its Degrading Abilities for the Bioremediation of Hydrocarbon Complex Mixtures. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 3152, 2020.

D'ANDREA, M. A.; REDDY, G. K. Crude Oil Spill Exposure and Human Health Risks. **Journal of Occupational & Environmental Medicine**, v. 56, n. 10, p. 1029–1041, out. 2014.

DECHSAKULWATANA, C. *et al.* Biodegradation of petroleum oil using a constructed nonpathogenic and heavy metal-tolerant bacterial consortium isolated from marine sponges, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Volume 10, Issue 6, 2022.

DHARMSTHITI, S. *et al.* Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 139–145, 1998.

DONG, C. *et al.* Draft Genome Sequence of *Sphingobium* sp. Strain C100, a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from the Deep-Sea Sediment of the Arctic Ocean. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. e01210-13, 2014.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 28–36, set. 2016.

EFFENDI, A. J. *et al.* Optimization of Enzymatic Bioremediation of Oil Contaminated Soil by Laccase from *Marasmiellus palmovorus* using Response Surface Methodology. **Jurnal Presipitasi : Media Komunikasi dan Pengembangan Teknik Lingkungan**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 453–463, 2021.

FENG, Z. *et al.* Genomic Characteristics and Functional Analysis of *Brucella* sp. Strain WY7 Isolated from Antarctic Krill. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 2281, 2023.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 803–816, nov. 2011.

FUENTES, S. *et al.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781–4794, jun. 2014.

GIOVANELLA, P. *et al.* A comprehensive study on diesel oil bioremediation under microcosm conditions using a combined microbiological, enzymatic, mass spectrometry, and metabarcoding approach. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–17, 2023.

GG, I.; OH, S. Role of Plasmid-Borne Genes in the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Consortium of Aerobic Heterotrophic Bacteria. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, [s. l.], v. 07, n. 01, 2016.

GRAN-SCHEUCH, A. *et al.* Isolation and Characterization of Phenanthrene Degrading Bacteria from Diesel Fuel-Contaminated Antarctic Soils. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 1634, 2017.

HUANG, J. *et al.* Effect of salinity on the growth, biological activity and secondary metabolites of some marine fungi. **Acta Oceanologica Sinica**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 118–123, 2011.

HUANG, L. *et al.* Research on the Isolation, Identification and Degradation Characteristics

of a Diesel Oil Degrading Strain. **Advanced Materials Research**, [s. l.], v. 641–642, p. 206–210, 2013.

IBRAHIM, M. L. *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28–34, jul. 2013.

JACOB, E. L.; MOHAN, A. P.; JOSEPH, A. V. Bioremediation of Petroleum-Polluted Soil Using Biosurfactant Producing Bacteria, *Pseudomonas sp.* **JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH**, [s. l.], v. 66, n. 01, p. 224–231, 2022.

JI, Y. *et al.* Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.

JOSEPH, D.; CHAKRABORTY, K. Production and Biotechnological Application of Extracellular Alkalophilic Lipase from Marine Macroalga-Associated *Shewanella* algae to Produce Enriched C20-22 n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 185, n. 1, p. 55–71, 2018.

KADRI, T. *et al.* Production and characterization of novel hydrocarbon degrading enzymes from *Alcanivorax borkumensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 112, p. 230–240, 2018.

KERTESZ, M. A.; KAWASAKI, A. Hydrocarbon-Degrading *Sphingomonads*: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, and *Sphingopyxis*. In: TIMMIS, K. N. (org.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1693–1705. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4_119. Acesso em: 13 mar. 2024.

KIM, J. M.; JEON, C. O. Isolation and Characterization of a New Benzene, Toluene, and Ethylbenzene Degrading Bacterium, *Acinetobacter sp.* B113. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 70–75, 2009.

KUBICKI, S. *et al.* Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 408, 2019.

KUMARASWAMY, S.; SINGARAM, J. Statistical optimization of lipase production from oil mill effluent by *Acinetobacter sp.* KSPE71. **Journal of the Serbian Chemical Society**, [s. l.], v. 87, n. 9, p. 997–1010, 2022.

KYE-HEON, OH; HYUNG-YEEL, KAHNG. Physiological Characterization of BTEX Degrading Bacteria *Microbacterium sp.* EMB-1 and *Rhodococcus sp.* EMB-2 Isolated from Reed Rhizosphere of Sunchon Bay. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 169–177, 2005.

LALUCAT, J. *et al.* Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 126289, 2022.

LEE, A. H. *et al.* A proposed stepwise screening framework for the selection of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading white rot fungi. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 767–783, 2020.

LIU, H. *et al.* Crude Oil Degradation by a Novel Strain *Pseudomonas aeruginosa* AQNU-1 Isolated from an Oil-Contaminated Lake Wetland. **Processes**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 307, 2022.

MAAMAR, A. *et al.* Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria). **Diversity**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 196, 2020.

MAHMOUD, G, A. *et al.* Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. **European Journal of Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 70-77, 2015.

MENEZES, C. B. A. *et al.* Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, ago. 2010.

MICHEL J, P. Marine Bioremediation - A Sustainable Biotechnology of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Coastal and Marine Environments. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 06, n. 02, 2015.

MOHAMMADI, L. *et al.* Petroleum Hydrocarbon Removal from Wastewaters: A Review. **Processes**, v. 8, n. 4, p. 447, 10 abr. 2020.

MOSHTAGH, B.; HAWBOLDT, K.; ZHANG, B. Biosurfactant production by native marine bacteria (*ACINETOBACTER CALCOACETICUS* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 2386–2397, 2021.

MUNRO, A. W. *et al.* What makes a P450 tick? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 140–150, mar. 2013.

MUTHUKUMAR, N. Role of *Brucella sp.* and *Gallionella sp.* in oil degradation and corrosion. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 421–425, 2003.

NRIOR, R. R.; JIRIGWA, C. C. Comparative bioremediation potential of *Mucor racemosus* and *Paecilomyces variotii* on crude oil spill site in Gio Tai, Ogoni land. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSRJESTFT)**, v. 11, n. 10, p. 49-57, 2017.

OHADI, M. *et al.* Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 12, p. 1–9, 2017.

OLIVERA, N. L. *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 19–26, 2009.

PASSARINI, M. R. Z. *et al.* Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

PÉREZ-PANTOJA, D.; GONZÁLEZ, B.; PIEPER, D. H. Aerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In: TIMMIS, K. N. (org.). **Handbook of Hydrocarbon and**

Lipid Microbiology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 799–837. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4_60. Acesso em: 20 mar. 2024.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short Communication: Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae* - an Antarctic strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.d.], v. 13, p. 137-139, 1997.

QIAO, N.; SHAO, Z. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 1207–1216, 2010.

RAMIREZ, M. I. *et al.* Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 415–425, dez. 2017.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, n. 2–3, p. 93–100, set. 1999.

SALAM, L. B.; OBAYORI, O. S.; OLATOYE, N. O. Biodegradation of anthracene by a novel actinomycete, *Microbacterium sp.* isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 335–341, 2014.

SALVÀ-SERRA, F. *et al.* Comparative genomics of *Stutzerimonas balearica* (*Pseudomonas balearica*): diversity, habitats, and biodegradation of aromatic compounds. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, p. 1159176, 2023.

SANTISI, S. *et al.* Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 377–387, 2015.

SHAIMERDENOVA, U. *et al.* Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 2294, 2024.

SIMISTER, R. L. *et al.* Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 327–333, 2015.

SINGH, P. *et al.* Biological degradation of toluene by indigenous bacteria *Acinetobacter junii* CH005 isolated from petroleum contaminated sites in India. **Energy, Ecology and Environment**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 162–170, 2018.

SPERB, J. G. C. *et al.* Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engvista**. v. 17, n. 3, 2015.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, jan. 2017.

VIEIRA, G. A. L. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 749–756, 2018.

VIJAYAKUMA, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 181–192, 2015.

WONGBUNMAK, A. *et al.* BTEX- and naphthalene-degrading bacterium *Microbacterium esteraromaticum* strain SBS1-7 isolated from estuarine sediment. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 339, p. 82–90, 2017.

YAO, W. *et al.* A Valuable Product of Microbial Cell Factories: Microbial Lipase. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 743377, 2021.

YETTI, E. *et al.* Screening of Marine Bacteria Capable of Degrading Various Polyaromatic Hydrocarbons. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 121, 2015.

ZADJELOVIC, V. *et al.* Genome of *Alcanivorax sp.* 24: A hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. **Marine Genomics**, [s. l.], v. 49, p. 100686, 2020.

ZAFRA, G.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 24, p. 19426–19433, 2015.

ZHAO, D. *et al.* Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 1244–1248, 2011