
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AYUMI DE AQUINO OTSUKA

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE
TOLUENO POR FUNGOS ISOLADOS DE
AMBIENTES ASSOCIADOS AO PETRÓLEO**



Rio Claro
2015

AYUMI DE AQUINO OTSUKA

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE TOLUENO POR FUNGOS
ISOLADOS DE AMBIENTES ASSOCIADOS AO PETRÓLEO

Orientador: Derlene Attili de Angelis

Co-orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

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

Rio Claro
2015

576 Otsuka, Ayumi de Aquino
O88a Avaliação da biodegradação de tolueno por fungos isolados de ambientes associados ao petróleo / Ayumi de Aquino Otsuka. - Rio Claro, 2015
81 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Derlene Attili de Angelis
Coorientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Microorganismos. 2. Hidrocarbonetos monoaromáticos. 3. BTEX. 4. Biorremediação. 5. Microbiologia. I. Título.

Aos meus queridos pais, irmãos e melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a toda minha família, aos meus avós, Bá e Di, e tia Ana, por todo o apoio, carinho e confiança, foi imprescindível para que chegasse até aqui e conquistasse tudo o que conquistei. Obrigada mãe por todo o amor e momentos juntas, por se fazer perto, mesmo longe, por ser a melhor amiga e mulher que já tive o prazer de conviver e aprender, e por ser assim, com um coração tão lindo. Pai, agradeço por ser sempre companheiro, carinhoso, devoto dos seus filhos e pais, presente e amigo, saiba do imenso amor, carinho e admiração que tenho. Aos meus irmãos e cunhadas, agradeço pela companhia, amizade, apoio e torcida, vocês são o que há de mais especial, sou a maior fã de vocês. Miguel, meu sobrinho, obrigada por ter nascido e trazido tanta luz, beleza, alegria e fofura para nossa vida.

À professora Derlene, que me acolheu em seu laboratório e em sua vida. Graças a você encontrei aquilo que temia não encontrar, um caminho. Obrigada por todo apoio de sempre, pelos ensinamentos e pela inspiração.

Um agradecimento em especial à professora Dejanira e Dilza, por serem sempre tão atenciosas, amáveis e amigas. Também agradeço todos os técnicos do departamento de Bioquímica e Microbiologia pelo apoio, paciência e ajuda.

Agradeço ao professor Fernando Pagnocca por ter sido um grande parceiro, ter aberto seu laboratório e permitido que lá eu crescesse pessoalmente e profissionalmente. Um obrigada a querida Weilan por ter sido minha professorinha no começo de tudo, me ensinando tantas coisas que levarei para sempre.

Ao Departamento de Física, Maristela e técnicos, por ter nos acolhido e nos dar todo suporte ao nosso laboratório. Em memória, agradeço ao professor Naves, por ter cedido um espaço para nossa equipe, por ter nos proporcionado tantas ideias e soluções, e por ter dividido seu entusiasmo e alegria com a gente.

À minha amiga Noemi, eu agradeço imensamente por ter me dado a mão, me acolhido e me ensinado tão pacientemente tudo. Você é especial e foi essencial para que conseguisse realizar este trabalho, ele também é um fruto seu.

Um obrigado especial ao professor Adilson, que tão prontamente nos ajudou e apoiou quando mais precisávamos, compartilhou seu laboratório, tempo e conhecimento conosco.

Agradeço à toda equipe do CPQBA, em especial à DRM, por terem aberto as portas para mim e meu projeto e por serem sempre tão atenciosos. Fernando e Jaque, muito obrigada pela paciência, pelas horas e dias que passaram me ajudando e me ensinando, grande parte deste trabalho se deve à vocês. Também agradeço a Juliane, por todo auxílio e apoio para realização desse trabalho.

Ao PRH-05, pelo auxílio, benefícios e cursos oferecidos. À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), pelo apoio financeiro, por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor Petróleo e Gás (PRH-ANP/MCT) e do Programa de Formação de Recursos Humanos da Petrobras, também agradeço a Fundunesp pelo apoio.

Obrigada aos meus amigos, novos e antigos, que de uma forma ou de outra participaram de toda essa jornada. Ao CBN10, foi incrível cada momento, obrigada cada um de vocês, vocês são excepcionais. Em especial, Dani e Nat, almas que se reconheceram na minha, obrigada por essa amizade especial. Também às minhas priminhas, desde sempre, até para sempre minhas melhores, agradeço por todos os momentos que vivemos e ainda vamos viver

Não poderia faltar o meu agradecimento ao meu melhor amigo, companheiro, parceiro e amigado. Meu amor, é incrível como um dia, uma hora, um ônibus e coincidências (ou seria mesmo o destino?) podem mudar toda nossa vida, eu conheci você há 5 anos e desde então você nunca escapou dos meus pensamentos e coração. Obrigada por todo o apoio, todos os dias, por toda paciência e principalmente por toda atenção, cuidado, carinho e amor. Amo você.

RESUMO

Derramamentos durante a cadeia produtiva do petróleo ocasionam importante contaminação de diversos ambientes, isto devido à toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos presentes. Destaca-se o tolueno, um composto agressivo ao sistema nervoso e teratogênico, com alta mobilidade e solubilidade em água, o que facilita o impacto ambiental. Estudos mostram que fungos são potenciais assimiladores de compostos aromáticos, incentivando pesquisas sobre sua utilização na recuperação de sítios contaminados. Este trabalho objetivou selecionar e caracterizar degradadores de tolueno com potencial para biorremediação. Cinquenta fungos foram selecionados da coleção de micro-organismos de interesse para petróleo, gás e biocombustíveis, da UNESP de Rio Claro, sendo todos isolados de ambientes associados ao petróleo. Foram realizadas duas triagens para seleção de um micro-organismo com maior capacidade de assimilação do hidrocarboneto. O primeiro teste consistiu na avaliação do crescimento fúngico, quando submetidos a uma atmosfera saturada de tolueno. Deste foram escolhidos os 24 fungos com melhor produção de biomassa para próxima triagem. O teste em placas foi realizado com aplicação do agente redox DCPIP, o qual indica degradação quando perde a coloração azul. A partir deste selecionou-se o isolado com maior crescimento e formação de halo incolor, o *Trichoderma* complexo *koningii* o qual teve posteriormente sua capacidade de degradação avaliada por meio de cromatografia gasosa. O experimento provou a eficiência da metodologia utilizada, com a obtenção de resultados positivos da validação do método e também demonstrou a eficiência dos frascos LA-PHA-PACK em evitar a volatilização do tolueno durante os 21 dias de experimento, sendo confiável a utilização deste para monitoramento do decaimento do tolueno associando-o a degradação. Resultado importante, pois são escassas metodologias e frascos eficazes para finalidade deste trabalho. No presente estudo os resultados de degradação não foram conclusivos, pois não demonstraram decaimento significativo da concentração do hidrocarboneto. O fato pode estar relacionado a concentração utilizada (1%), na literatura encontram-se concentrações significativamente menores. Devido aos resultados positivos nas triagens, esperam-se bons resultados de degradação do fungo selecionado quando repetida a metodologia de cromatografia utilizando concentrações mais baixas.

ABSTRACT

Spills can occur during oil productive chain and contaminate various environments due to the toxicity of monoaromatic hydrocarbons. Toluene stands out for being aggressive to the nervous system and teratogenic, with high mobility and solubility in water, which facilitates environmental impact. Studies show that fungi are potential aromatic compounds assimilators, encouraging new researches about its use on the recovery of contaminated sites. This study aimed to select and characterize fungus with potential for biorremediation of toluene. 50 fungi were selected of the Collection of Microorganisms of Interest for Oil Gas and Biofuels, of UNESP Rio Claro, all of which were isolated from sites contaminated with monoaromatic hydrocarbons. Two trials were realized to select the microorganism with greater potential. The first test evaluated fungal growth under toluene saturated atmosphere. 24 fungi were chosen because its greater biomass production to participate in the next trial, the degradation in plates test, where the blue redox agent, DCPIP, indicates the degradation reaction, turning colorless. From this test it was possible to select one isolate which showed higher growth and stronger medium discoloration as the microorganism with the greatest potential to assimilate toluene. The *Trichoderma cf. koningii* had its potential evaluated through gas chromatography. The experiment proved the efficiency of the methodology, with positive results from the method validation and the effectiveness demonstrated of the LA-PHA-PACK bottles to prevent the volatilization of toluene during the 21 days of experiment. Being reliable its use for monitoring toluene decay associating it with degradation. These results are important because there aren't many methodologies and vials efficient to the purpose of this work. In the present study the degradation rates demonstrated no significant decay of the concentration of hydrocarbon. That may be related to the toluene concentration used (1%), in other papers are found significantly lower concentrations. That may be related to the toluene concentration used (1%), in other papers are found significantly lower concentrations. Due to the positive results in screening, it's expected good results of degradation with the fungus selected when repeating the chromatography method using lower concentrations.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
3 JUSTIFICATIVA.....	14
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
4.1 Situação do Problema.....	15
4.2 Micro-organismos e biorremediação.....	18
4.2.1 Fungos e biorremediação.....	20
4.2.2 <i>Cladophialophora psammophila</i>	23
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 Triagem.....	24
5.1.1 Teste em dessecadores com atmosfera saturada em tolueno.....	24
5.1.2 Screening em placas para ensaios de biodegradação de tolueno.....	25
5.2 Ensaio de Cromatografia Gasosa.....	26
5.2.1 Coleta do solo para microcosmo.....	26
5.2.2 Caracterização microbiológica do solo.....	26
5.2.3 Preparo do solo.....	27
5.2.3.1 <i>Capacidade de Campo (CC)</i>	27
5.2.3.2 <i>Preparo do inóculo</i>	27
5.2.4 Frasco utilizado.....	28
5.2.5 Tratamentos realizados.....	29

5.2.6 Análise da degradação de tolueno na amostra.....	30
5.2.6.1 <i>Validação do método de extração de tolueno do solo</i>	30
5.2.6.1.1 <u>Exatidão do processo de extração</u>	31
5.2.6.1.2 <u>Exatidão do método de análise</u>	32
5.2.6.1.3 <u>Precisão</u>	32
5.2.6.1.4 <u>Limites de detecção e quantificação</u>	33
5.2.6.1.5 <u>Linearidade</u>	33
5.2.6.1.6 <u>Faixa linear</u>	34
5.2.6.2 <i>Extração dos analitos</i>	34
5.3 Preservação das linhagens utilizadas	35
5.3.1 Ultracongelamento a -80 °C.....	35
5.3.2 Método de Castellani.....	35
5.4 Identificação dos isolados	35
5.4.1 Análise morfológica.....	35
5.4.2 Análise molecular.....	36
5.4.2.1 <i>Extração do DNA genômico</i>	36
5.4.2.1.1 <u>Leveduras</u>	36
5.4.2.1.2 <u>Fungos filamentosos</u>	36
5.4.2.2 <i>Eletroforese</i>	37
5.4.2.3 <i>Amplificação do DNA ribossomal – PCR</i>	38
5.4.2.4 <i>Purificação dos produtos da Amplificação (PCR)</i>	38

5.4.2.5 Reação de sequenciamento.....	39.
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6.1 Triagem.....	40
6.1.1 Teste em dessecadores com atmosfera saturada em tolueno.....	40
6.1.2 Triagem em placas para ensaios de biodegradação de tolueno.....	42
6.2 <i>Trichoderma cf koningii</i>.....	43
6.3 Solo para ensaio de Cromatografia gasosa.....	44
6.3.1 Análise química.....	44
6.3.2 Análise microbiológica.....	44
6.3.3 Cálculo da Capacidade de Campo.....	45
6.4 Validação do método analítico.....	45
6.4.1 Exatidão.....	45
6.4.2 Exatidão do processo de extração.....	47
6.4.3 Exatidão do método de análise.....	47
6.4.4 Precisão (repetibilidade).....	48
6.4.5 Limites de detecção e quantificação.....	49
6.4.6 Linearidade e faixa linear.....	51
6.5 Cromatografia.....	51
6.6 Preservação.....	55
6.7 Identificação.....	56
7 CONCLUSÕES.....	58

REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A - Tabela com os valores de biomassa.....	69
APÊNDICE B – Ficha Catalográfica	70
APÊNDICE C – Ficha Catalográfica.....	72
APÊNDICE D – Ficha Catalográfica.....	74
APÊNDICE E– Ficha Catalográfica.....	76
APÊNDICE F– Ficha Catalográfica.....	78
ANEXO A - Análise química do solo.....	80
ANEXO B - Análise química do solo.....	81

1 INTRODUÇÃO

Durante a cadeia produtiva do petróleo, ou seja, sua extração, refino, transporte e utilização de seus produtos, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, assim como demais componentes do petróleo e derivados, são introduzidos no ambiente em grandes quantidades (BARBOSA et al., 2009), acarretando a contaminação de diversos ambientes e microambientes, colocando em risco os sistemas biológicos. Devido à grande demanda do petróleo pela indústria e o incentivo cada vez maior por sua exploração, a indústria do petróleo é uma das principais responsáveis por liberar compostos orgânicos para o meio ambiente. Tais ocorrências exigem a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados (AISLABIE; SAUL; FOGHT, 2006; MARÍN et al., 2006).

Uma possibilidade é a aplicação de micro-organismos para degradação dos compostos poluentes, pelo processo denominado biorremediação. Este baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação (BERNOTH et al., 2000), diminuindo o contaminante a substâncias com massa molecular menor e maior polaridade, ou a CO_2 e H_2O mediante mineralização da molécula (ALEXANDER, 1999). A literatura recomenda a utilização de micro-organismos isolados do local contaminado, pois sobrevivem graças à habilidade metabólica de assimilar as substâncias tóxicas (SARKAR et al., 2005).

Fungos filamentosos e leveduras têm sido amplamente estudados para degradação de compostos orgânicos tóxicos (SINGH, 2006). Fungos são recomendados para o processo de biorremediação devido à capacidade de adaptar o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia rapidamente, além de algumas espécies serem hábeis em se adaptar a condições extremas. Essa plasticidade se deve à produção de grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, capazes de degradar diversas fontes de carbono, inclusive polímeros complexos (SILVA; ESPOSITO, 2004). Ainda, os fungos filamentosos possuem eficiente colonização e exploração de substratos como solos contaminados, por possuir crescimento filamentoso e ramificado (GADD, 2001).

Dentre os benefícios e vantagens da biorremediação está o baixo custo, a possibilidade de tratamento natural localizado, não utiliza produtos químicos, não há grande interferência humana, e promove diminuição do resíduo a níveis aceitáveis.

Por isso, o método de biorremediação tem sido considerado um dos mais eficientes, destacando-se nos últimos anos como uma solução efetiva para a eliminação de diversos poluentes, entre eles os produtos do petróleo (PALA, 2006).

O petróleo é composto em 90% por hidrocarbonetos, que incluem os saturados, os hidrocarbonetos aromáticos e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre; resinas e asfaltenos (ZILIO e PINTO, 2002). Os hidrocarbonetos aromáticos são mais tóxicos e possuem maior mobilidade em água que os compostos alifáticos com mesmo número de carbono (TIBURTIUS; ZAMORA; LEAL, 2004).

Dentre os compostos orgânicos voláteis encontrados no petróleo estão os hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). São particularmente estudados por apresentarem propriedades tóxicas, por serem os mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel, e os constituintes mais solúveis em água e móveis. Dessa maneira são facilmente transportados para locais distantes do ponto de origem, e facilita a contaminação de lençóis freáticos. E ainda, o seu pequeno tamanho molecular e baixo ponto de ebulição, contribuem para que volatilizem em temperatura ambiente constituindo um contaminante atmosférico importante (BARKER; CHATZIS; OLIVEIRA, 1995).

O tolueno ($C_6H_5CH_3$), hidrocarboneto de interesse nesse estudo, é muito utilizado como solvente para diversas substâncias (MITRA; ROY, 2011). Apresenta toxicidade crônica mesmo em pequenas concentrações, sendo um conhecido supressor do sistema nervoso central (ATSDR, 2004; MELQUIADES et al., 2006), além de ser considerado teratogênico (HAMMER, 2002). Podendo ser letal após uma hora de exposição à concentração de 1800 – 2000 ppm (HOBARA et al., 2000). Apesar disso, grande quantidade de tolueno ainda é introduzida no ambiente anualmente com o uso da gasolina e dos processos de refinamento de petróleo (FOSTER; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994), mostrando a elevada importância em se desenvolver em estudos sobre a remediação desse composto.

Nesse contexto, o presente estudo buscou a seleção e a caracterização de fungos assimiladores de tolueno. Além de objetivar a aplicação destes micro-organismos para remediação de sítios contaminados, as linhagens e as informações a elas associadas fomentarão o banco de dados e o acervo da coleção de micro-organismos de interesse para petróleo, gás e biocombustíveis da UNESP de Rio Claro.

2 OBJETIVOS

A partir de um conjunto de 50 isolados, escolhidos por sua associação com ambientes contaminados por hidrocarbonetos e por apresentarem bom crescimento em condições de laboratório, objetivou-se:

- Utilizar dois métodos de triagem para seleção de um isolado de maior potencial para assimilação de tolueno, com base em:
 - Testes de produção de biomassa em atmosfera saturada de tolueno;
 - Ensaio de biodegradação de tolueno em placas.
- Após a seleção do isolado, avaliar sua capacidade de degradação, mediante análise do decaimento de tolueno utilizando cromatografia gasosa, tendo como referência a linhagem padrão CBS 110553 – *Cladophialophora psammophila* indicada na literatura pela sua capacidade de utilizar o tolueno como única fonte de carbono e energia (BADALI et al., 2011).
- Caracterizar os isolados estudados e fomentar o acervo e o banco de dados da coleção de micro-organismos de interesse para petróleo, gás e biocombustíveis, da UNESP de Rio Claro.

3 JUSTIFICATIVA

A indústria do petróleo é uma das principais responsáveis por liberar compostos orgânicos para o meio ambiente, seja via gás, efluente ou por meio de sedimentos. Alguns desses compostos estão incluídos na “*Priority List*” de substâncias perigosas feita pela EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), como os hidrocarbonetos poli-aromáticos (HPAs), BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), entre outros (ATSDR, 2013). Uma estratégia promissora para a recuperação de locais contaminados baseia-se na aplicação de micro-organismos para degradação dos compostos poluentes, mediante o processo denominado biorremediação. A versatilidade microbiana é excelente para tolerância às condições extremas, possuem grande capacidade para se adaptar, modificando sua maquinaria enzimática para enfrentar novos desafios no ambiente.

A biorremediação promove tratamento do ambiente sem grande interferência humana e além de tudo é viável financeiramente, pois seu custo é extremamente baixo em comparação com outros processos principalmente físicos, como extração de vapor do solo e bombeamento, entre outros, os quais são de alto custo, e podem gerar problemas adicionais. Ainda as técnicas de biorremediação não utilizam água tratada e nem produtos químicos nocivos ao meio ambiente.

Na UNESP de Rio Claro existe uma linha de pesquisa, determinada a investigar a aplicação de fungos para degradação de compostos monoaromáticos – BTEX. Comparado às bactérias, os fungos se destacam pela grande diversidade espécies em ambientes terrestres, por apresentarem maior tolerância a estresse osmótico e variação de temperatura, capacidade de viver em meios com pH ácido (pH 5,5), crescimento em ambientes com baixo grau de umidade, menor necessidade de nitrogênio, tolerância a altas concentrações de gás carbônico, capacidade de degradar moléculas complexas como a lignina e, principalmente, não apresentam restrição quanto ao tamanho da cadeia do hidrocarboneto a ser degradada (ROSATO, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2003). Vários trabalhos mencionam o potencial dos fungos para biorremediação, inclusive alguns anteriormente desenvolvidos junto ao programa de recursos humanos do Instituto de Geociências - PRH-05 (PRENAFETA-BOLDÚ, 2001; SATOW, 2008; ZHAO et al, 2010; BARON, 2011; BARON, 2014; ATTILI-ANGELIS et al, 2014).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Situação do Problema

O petróleo e seus derivados são utilizados pela sociedade desde 5 mil anos a.C. (NEIVA, 1986), principalmente como lubrificante, querosene para lâmpadas e na pavimentação até surgir a indústria petroquímica em 1930, que possibilitou utilizar-se de derivados de petróleo como componentes de explosivos (glicerina e tolueno), material sintético para vestimentas, como solventes, medicamentos, entre outras utilizações. Com a criação do motor de combustão interna e sua adoção nos meios de transporte, o consumo do petróleo e subprodutos aumentou, o que elevou sua demanda, produção, transporte e distribuição (CORREIA, 2003). A indústria do petróleo cresce progressivamente, com o avanço da tecnologia são descobertos e explorados novos campos petrolíferos, com destaque atualmente para as camadas do pré-sal, são também construídos ou ampliados terminais de carga e descarga de óleo e gás natural, assim como dutos e refinarias.

O petróleo é composto em 90% por hidrocarbonetos, que incluem os saturados (alcanos de cadeia normal e ramificada, e cicloalcanos); os hidrocarbonetos aromáticos, os quais incluem moléculas puras, cicloalcano-aromáticos (nafteno-aromáticos) e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre; resinas e asfaltenos, (componentes policíclicos, de alta massa molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio) (ZILIO; PINTO, 2002). Hidrocarbonetos são formados por carbono e hidrogênio, componentes que variam em número entre diferentes hidrocarbonetos, produzindo pequenas diferenças na estrutura molecular, porém notáveis diferenças entre as propriedades físicas e químicas. Os alcanos apresentam cadeia aberta com simples ligações, desprovidos de insaturação, como exemplo o metano (CH_4). Os cicloalcanos possuem cadeia saturada e fechada, são hidrocarbonetos de médio e a elevada massa molecular (C_{10} a C_{35}), apresentando arranjo de 1 a 6 ciclos (PETERS; MOLDOWAN, 1993). Os hidrocarbonetos aromáticos possuem carbonos e hidrogênios que se juntam num composto cíclico com ligações simples e duplas alternadas, o conhecido anel benzênico. Também estão presentes no petróleo os compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que possuem de 2 a 4 anéis benzênicos condensados (BENTO, 2005).

No Brasil, cerca de 20% do petróleo processado é convertido em gasolina automotiva e 36% em óleo diesel (MME-DNC, 1995). A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos parafínicos, oleofínicos, naftênicos e aromáticos. Sendo que os compostos aromáticos constituem cerca de 10 a 59%, e os alifáticos 41 a 62%. Os hidrocarbonetos aromáticos são mais tóxicos e possuem maior mobilidade em água que os compostos alifáticos com mesmo número de carbono (TIBURTIUS; ZAMORA; LEAL, 2004).

A indústria do petróleo é uma das principais responsáveis por liberar compostos orgânicos para o meio ambiente, seja via gás, efluente ou por meio de sedimentos. Os BTEX são hidrocarbonetos monoaromáticos mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel, são os constituintes mais solúveis em água e móveis. Dessa maneira são mais facilmente transportados para locais distantes do ponto de origem. E ainda, o seu pequeno tamanho molecular e baixo ponto de ebulição, contribuem para volatilizarem em temperatura ambiente constituindo um contaminante atmosférico importante (ARAÚJO, 2010 apud BARKER; CHATZIS; OLIVEIRA, 1995).

Falhas e descuidos nos processos industriais acarretam a contaminação do solo e das águas subterrâneas. Os BTEX são os primeiros a contaminar o solo infiltrando no subsolo e contaminando o lençol freático e, conseqüentemente, os rios. A ocorrência de contaminantes no solo, provocam inúmeras consequências negativas para os ecossistemas e recursos naturais (RODRIGUES; DUARTE, 2003). São poderosos agentes depressores do Sistema Nervoso Central e causam leucemia (EVANS et al., 1991; CORSEUL; ALVAREZ, 1996.), toxicidade crônica mesmo em baixas concentrações, são cancerígenos e possuem efeito teratogênico. Podendo afetar tanto os animais e como os seres humanos (PEDROZA, 2009). Estudos demonstraram a rápida absorção dos compostos BTEXs pela via pulmonar de humanos e animais, (PEDROZO et al., 2002).

O tolueno ($C_6H_5CH_3$), hidrocarboneto monoaromático alvo deste estudo, é encontrado tanto no petróleo bruto quanto em seus derivados, é um solvente orgânico volátil, muito utilizado na produção de tintas, resinas, produtos de limpeza e em acabamentos de couro e móveis (SILVA; MAINIER, 2004; MITRA; ROY, 2011). Possui alta toxicidade, quando inalado ou ingerido em pequenas quantidades causa dores de cabeça, confusão mental, fraqueza, perda de memória e pode afetar também as funções dos rins e fígados. Quando ingerido os sintomas mais comuns são irritação

da boca e faringe, vômitos, dores abdominais e diarreia. E quando inalados seus vapores pode ocorrer euforia, instabilidade emocional, cefaléia, vertigens, náuseas, e vômitos. Se a exposição a esse agente tóxico for prolongada pode acontecer o ressecamento da pele, perda de apetite, náusea, danos aos rins e fígado e pode causar danos ao cérebro (PREDROZO et al., 2002; TIBURTIUS; ZAMORA; LEAL, 2004), podendo ser letal (HOBARA et al., 2000).

Apesar de serem os compostos mais solúveis do petróleo a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos possuem pouca solubilidade em água, sendo que sua solubilidade efetiva no ambiente depende do “efeito de co-solvência”, com o qual sua transferência é facilitada por um composto mais solúvel. Por exemplo, o tolueno e todos os BTEX são miscíveis em álcoois primários (metanol e etanol), os quais são altamente solúveis em água (SILVA et al., 2002). Buscando diminuir a poluição gerada por automóveis, o etanol tem sido utilizado como ingrediente na formulação da gasolina (CORSEUIL et al., 1998). A combinação de etanol com os compostos monoaromáticos eleva o risco de contaminação aumentando a solubilidade destes na água (SPINELLI, 2007). No Brasil, a gasolina é aditivada com 20-25% de etanol (FERNANDES, 2002; CIMA, 2013), permitindo a solubilização de elevadas taxas de tolueno isto permite que este fique retido no solo não apenas na fase gasosa, aumentando a probabilidade de seu lixiviamento e de contaminação do subsolo e aquíferos (MELQUIADES et al., 2006).

A liberação dos hidrocarbonetos do petróleo para sub-superfície ocorre com a migração do líquido através da zona não saturada do subsolo, com poros que retêm o produto, o que se denomina fase residual. Quando o contaminante alcança o lençol freático, por ser pouco solúvel, é formada a fase líquida não aquosa (NAPL). A duração da transferência depende da massa do NAPL (leve ou pesado, de acordo com densidade do hidrocarboneto) (GUIGUER, 1996) e da sua taxa de dissolução na água subterrânea, que é afetada por diversos fatores, tais como volatilidade, solubilidade do contaminante, velocidade do fluxo do aquífero, arranjo e tamanho dos poros, composição da mistura de fluidos (BACKET; HUNTLEY, 2002). No caso de NAPL com densidade menor que a da água, o líquido se deposita no topo do nível d'água, formando uma fase livre (GUSMÃO, 2002). Essa transferência dos contaminantes para o lençol freático se dá tanto a partir da fase livre como da fase residual, gerando uma pluma de contaminação.

Como os anéis aromáticos são de difícil degradação, são persistentes no ambiente por um longo período prejudicando os ecossistemas (SINGH, 2006). Assim, os hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e nos animais, se ligam às moléculas proteicas e ao tecido gorduroso, e são transferidos através da cadeia alimentar sem alterações de sua estrutura (TIBURTIUS; ZAMORA; LEAL, 2004). Por esta razão a contaminação por hidrocarbonetos é considerada uma das grandes preocupações ambientais, uma vez que interfere em todo ecossistema da área afetada, poluindo solo, ar, águas superficiais e subterrâneas, fauna, flora e microbiota. E ainda, a contaminação de águas afeta o desenvolvimento socioeconômico da região, pois dificulta atividades de recreação, pesca e degrada a paisagem, prejudicando o turismo, o desenvolvimento industrial e da agricultura (PHILLIPI JR. E MARTINS, 2005).

4.2 Micro-organismos e biorremediação

Uma estratégia promissora para a recuperação de locais contaminados se baseia na aplicação de micro-organismos para degradação dos compostos poluentes, mediante o processo denominado biorremediação. A versatilidade microbiana é excelente para tolerância às condições extremas, possuem grande capacidade para se adaptar, modificando sua maquinaria enzimática para enfrentar novos desafios no ambiente. Nos micro-organismos podem-se encontrar atividades catabólicas de grande interesse, possíveis atuantes na biorremediação de ambientes fortemente contaminados com compostos orgânicos recalcitrantes tóxicos (TORTELLA; DIEZ; DURAN, 2005). A biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade dos micro-organismos autóctones (encontrados no local da contaminação), sendo uma medida passiva de remediação (chamada de biorremediação natural), ou ainda pode ser adicionado agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) ou realizar o bioaumento, inoculando consórcios microbianos enriquecidos ou uma linhagem reconhecida degradadora (BENTO; CAMARGO; OKEKE, 2003). Essa técnica busca a recuperação ou remediação de áreas contaminadas, o tratamento de efluentes ou resíduos sólidos contaminados, diminuindo o contaminante a substâncias menos tóxicas, ou a mineralizando a molécula (ALEXANDER, 1999).

A biorremediação promove tratamento do ambiente sem grande interferência humana e além de tudo é viável financeiramente, pois seu custo é extremamente baixo em comparação com outros processos principalmente físicos, como extração de vapor do solo e bombeamento, entre outros, os quais são onerosos, e podem gerar problemas adicionais. Por isso, o método de biorremediação tem sido considerado um dos mais indicados para tratar ambientes contaminados, destacando-se nos últimos anos para a eliminação de poluentes, como os produtos do petróleo (PALA, 2006).

Entretanto, o processo é lento e, frequentemente, faz-se necessário o isolamento da área contaminada. A aplicação das técnicas pode ser feita no local (*in situ*) ou *ex situ*, quando há a remoção do solo contaminado devido a riscos de dispersão do poluente para os lençóis freáticos ou alastramento da área contaminada. O processo *in situ* quando possível é mais viável, tanto economicamente e ambientalmente, ocasionando menos distúrbios ambientais (NANO; BORRONI; ROTA, 2003; MARIANO, 2006).

Segundo Gutnick e Rosenberg (1977) os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos possuem três características essenciais, um sistema eficiente para absorver os hidrocarbonetos de interesse, com sítios especiais de ligação e/ou produção de substância emulsificante para auxiliar o transporte do hidrocarboneto para dentro da célula, enzimas oxigenases específicas e especificidade induzida, com resposta positiva ao petróleo. E as estratégias de biorremediação se dividem em três categorias gerais, ou o composto alvo é usado como fonte de carbono e energia, ou é enzimaticamente atacado, mas usado como uma fonte de carbono (co-metabolismo), ou, por fim, o alvo composto não é metabolizado, mas é absorvido pelo organismo (bioacumulação). Fungos têm-se mostrado mais eficientes com co-metabolismo e bioacumulação do que no uso de xenobióticos como únicas fontes de carbono (BENNETT; WUNCH; FAISON, 2001).

A reação de biodegradação de hidrocarbonetos por micro-organismos baseia-se em reações de oxidação – redução, nas quais os mesmos são oxidados na presença de receptores terminais de elétrons como o oxigênio, nitrato, ferro (III), sulfato e dióxido de carbono. As vias de degradação podem ser aeróbias e anaeróbias, de acordo com o modo de obtenção de energia dos micro-organismos. No processo aeróbio o oxigênio age como receptor final de elétrons e origina como produtos o dióxido de carbono, água e a biomassa celular, e na degradação anaeróbia, os receptores finais de elétrons são elementos químicos como o nitrato, manganês, íon

de ferro (III) e dióxido de carbono (NUNES; CORSEUIL, 2007). A degradação aeróbia é reconhecida mais eficiente e rápida para a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos, ressaltando a necessidade de oxigênio no sistema para aplicação de técnicas de biorremediação.

4.2.1 Fungos e biorremediação

Os fungos são micro-organismos pertencentes ao Reino Fungi, e possuem conhecida importância para a natureza e o ecossistema, são os principais recicladores de nutrientes orgânicos; degradam a matéria orgânica, liberam o dióxido de carbono na atmosfera e retornam, ao solo, os compostos nitrogenados e outras substâncias (OLIVEIRA, 2008). Estão amplamente distribuídos na natureza, são encontrados em quase todos os ambientes do planeta Terra, desde no ar atmosférico, água, solo, até como parasitas de plantas e animais. Possuem forma, tamanho, cor e textura muito variadas, podem ainda ser organismos unicelulares, como as leveduras ou então pluricelulares, como os fungos filamentosos. Além da importância natural dos fungos, algumas espécies contribuem economicamente para o homem, por exemplo, são utilizados na produção de compostos de interesse comercial, como enzimas, antibióticos, vitaminas, pigmentos, álcoois, ácidos orgânicos, produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos entre outros, são utilizados também como bioinseticidas e atuam na produção de biocombustíveis. Devido sua capacidade de degradar, transformar e mineralizar compostos orgânicos, eles são considerados como possíveis degradadores de poluentes ambientais, como o petróleo e derivados.

Os fungos têm sido especialmente estudados para degradação de compostos orgânicos tóxicos (SINGH, 2006), devido à capacidade de adaptar o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia rapidamente, além de algumas espécies serem hábeis em se adaptar a condições extremas. Essa plasticidade se deve à produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, capazes de degradar diversas fontes de carbono, inclusive polímeros complexos (SILVA; ESPOSITO, 2004).

Ainda, os fungos filamentosos possuem eficiente colonização e exploração de substratos como solos contaminados, devido seu modo de crescimento filamentoso e ramificado (GADD, 2001). Em relação às bactérias, os fungos destacam-se pela grande diversidade espécies em ambientes terrestres, por apresentarem maior

tolerância a estresse osmótico e variação de temperatura, capacidade de viver em meios com pH ácido (pH 5,5), crescimento em ambientes com baixo grau de umidade, menor necessidade de nitrogênio, tolerância a altas concentrações de gás carbônico, capacidade de degradar moléculas complexas como a lignina e, principalmente, não apresentam restrição quanto ao tamanho da cadeia do hidrocarboneto a ser degradada (ROSATO, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

A capacidade de assimilar e tolerar hidrocarbonetos do petróleo tem sido observada em várias espécies de fungos. Desde 1950, vêm sendo isolados vários fungos, degradadores de compostos derivados do petróleo, principalmente os pertencentes dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium* (JACQUES, 2005). Espécies de fungo negro também tornaram-se de especial interesse em virtude da proteção e resistência que o pigmento melanina concede à sua parede celular. Possuem caráter extremófilo e oligotrófico e vem sendo relatadas como degradadoras de hidrocarbonetos, incluindo os BTEX (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002; ZHAO et al., 2010).

Cinco isolados fúngicos, identificados como deuteromicetos pertencentes aos gêneros *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Leptodontium*, e o ascomiceto *Pseudeurotium zonatum*, foram reconhecidos como capazes de crescer em tolueno. Foram isolados de solo e águas subterrâneas de ambientes contaminados com gasolina a partir de culturas de enriquecimento, como sendo uma das técnicas culturas líquidas, onde o crescimento dos fungos foi favorecido pela combinação de baixo pH e baixa atividade de água, o que sugere que estes podem ser utilizados em biofiltros de ar para a purificação de fluxos de gás que contêm hidrocarbonetos aromáticos (PRENAFETA-BOLDU et al., 2001). Os resultados foram comparados com o fungo *Cladosporium sphaerospermum*, isolado de biofiltro utilizado para remover tolueno de ar, o primeiro eucarioto descrito como degradador de tolueno (WEBER; HAGE; DE BONT, 1995). Em um próximo estudo a linhagem *Cladophialophora* sp. T1 (ATCC MYA-2335), isolada de solo, foi capaz de crescer numa fração solúvel em água de gasolina que continha os 6 componentes BTEX. Benzeno não foi metabolizado, mas tolueno, etilbenzeno e xilenos foram degradados por uma combinação de assimilação e co-metabolismo. Estes três componentes foram degradados na cadeia lateral pela enzima monooxigenase (PRENAFETA-BOLDU et al., 2002).

Nikolova e Nenov, 2005, mostraram o potencial dos fungos *Cladophialophora* sp. e *Cladosporium* sp. degradarem o BTEX. O etilbenzeno foi facilmente degradado em todos os casos, mas nenhum dos isolados foi capaz de degradar o benzeno. *Cladophialophora* sp. degradou totalmente o orto e meta-xileno, tanto como substratos individuais e em misturas com tolueno, enquanto *Cladosporium* sp. foi capaz de degradá-los completamente apenas na presença de tolueno. O para-xileno foi apenas parcialmente assimilados em todos os testes.

Barbosa et al. (2009), utilizaram uma cepa de *Aspergillus niger* em reatores em batelada, para tratamento de água contaminada por BTX. Os autores concluíram que este micro-organismo foi capaz de assimilar o benzeno e o tolueno do sistema. Outros gêneros também foram relatados como tolerantes e possíveis assimiladores de hidrocarbonetos. Davies e Westlake (1979) verificaram o crescimento de 60 isolados fúngicos em n-tetradecano, tolueno, naftaleno e sete óleos brutos de petróleo de várias composições. Quarenta apresentaram crescimento em um ou mais dos óleos brutos de petróleo, sendo que 28 destes foram isolados de solo. Os gêneros isolados de solos, normalmente possuem grande produção de conídios, como *Verticillium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e são ótimos em assimilar hidrocarbonetos.

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Gongronella*, foram citados como possíveis degradadores dos hidrocarbonetos do petróleo (saturados e aromáticos) com taxas de degradação variando de 5 a 49%. As espécies *Beauveria alba*, *Penicillium simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *P. fenophilum* e *Acremonium strictum* apresentaram as maiores taxas de degradação, cujos valores corresponderam a 49, 45, 40, 33 e 33%, respectivamente (CHAÎNEAU et al, 1999). Araújo e Lemos (2002) também selecionaram fungos com capacidade de degradar petróleo, sendo 87,5% de linhagens degradadoras, as quais foram agrupadas nos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. Em outro estudo de WU e colaboradores (2010), selecionaram três cepas isoladas de solos contaminados com petróleo para degradação de BTEX. Também foi investigado o impacto do tempo de degradação, teor de oxigênio, a relação N/P, pH, quantidade de inóculo e concentração de hidrocarbonetos de petróleo na eficiência de remoção dos mesmos do solo. Os resultados demonstraram que a maior eficiência de remoção de BTEX foi obtida pelo fungo F3 (*Trichoderma* sp.) obteve maior eficiência de remoção de BTEX e que o impacto de concentração de hidrocarbonetos de petróleo sobre a biodegradação foi

significante, sendo mais degradado quando a maior concentração do estudo foi utilizada, 6.78 g.m⁻³.

4.2.2 *Cladophialophora psammophila*

A espécie *Cladophialophora psammophila*, linhagem ATCC MYA-2335 (CBS 110553) foi isolada pela primeira vez em 2001, a partir de solo contaminado com BTEX. Neste estudo o fungo provou ser capaz de crescer utilizando tolueno e outros alquilbenzenos como única fonte de carbono e energia (PRENAFETA-BOLDU et al. 2001). Foi demonstrada novamente esta capacidade de degradação durante novos estudos (PRENAFETA-BOLDU et al, 2002; 2004). A espécie foi descrita por BADALI (2011), foi feita as descrições morfológicas e molecular, e foi avaliada a habilidade de assimilação de tolueno, a susceptibilidade a antifúngicos e sua virulência. Os testes de patogenicidade feitos em ratos indicaram que a linhagem *C. psammophila* CBS 110553 não possui fatores de virulência, fato que é corroborado pelo fato de o fungo não se desenvolver a temperaturas acima de 37°C. O antifúngico contra o qual é mais resistente é o Fluconazol, com a concentração mínima de 32 mg/L. O teste de degradação, utilizando cromatografia gasosa, demonstrou que cerca de 80% do tolueno foi recuperado na forma de CO₂, o que indica uma mineralização de quase a totalidade do composto tóxico, comprovando sua habilidade de utilização deste hidrocarboneto como única fonte de carbono e energia. Por este motivo, é o fungo utilizado no presente estudo como um controle positivo de assimilação de tolueno.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Triagem

5.1.1 Teste em dessecadores com atmosfera saturada em tolueno

Metodologia para triagem foi adaptada de Zhao et al. (2010). Os 50 isolados foram pré-selecionadas a partir de estudos realizados anteriormente, os quais buscaram o isolamento de possíveis degradadores de hidrocarbonetos (SILVA-CRUZ, 2010; BARON, 2011; DUARTE et al., 2012). Esses fungos foram crescidos em ágar malte 2% por 7 dias e posteriormente inoculados em duplicata nos tubos de cultura (10 mL), previamente pesados em balança analítica, contendo 3 mL de meio mineral (2 mL de solução de micronutrientes: FeCl_3 120mg; H_3BO_3 350mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10mg; KI 10mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 45mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 75mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50mg; $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,25g; NaCl 10,0g; água destilada q.s.p. 1000mL; para 1L de solução de macronutrientes: KH_2PO_4 4,5g; K_2HPO_4 0,5g; NH_4Cl 2,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g; água destilada q.s.p. 1000mL).

Os tubos foram cobertos com folha de alumínio e incubados em dessecadores. Foram preparados três tratamentos:

1 – Controle positivo de crescimento: Nenhuma fonte de hidrocarboneto volátil foi adicionada. No interior do dessecador apenas os tubos contendo o inóculo em meio mineral adicionado de 4% de glicose como fonte de carbono, demonstrando o crescimento fúngico utilizando uma fonte de carbono simples;

2 – Tratamento Tolueno: No interior do dessecador havia o inóculo em meio mineral e um béquer (50 mL) contendo 15 mL de tolueno, criando-se uma atmosfera saturada de tolueno, o qual constituirá a única fonte de carbono disponível para o crescimento dos micro-organismos;

3 – Controle negativo de crescimento: No interior do dessecador havia o inóculo em meio mineral, sem glicose ou tolueno, demonstrando o crescimento dos fungos na ausência de fontes de carbono.

Os dessecadores foram fechados e incubados em temperatura ambiente por um período de 30 dias. Após o período de incubação foi avaliado o crescimento de biomassa a partir da medida de seu peso seco. O conteúdo dos tubos foi submetido à secagem por 24 horas em estufa a 105 °C e então pesado em balança analítica para a obtenção dos valores de biomassa produzida. Os isolados com os melhores resultados foram selecionados para o próximo *screening*.

5.1.2 Screening em placas para ensaios de biodegradação de tolueno.

O potencial de degradação de BTEX pelos isolados também foi avaliado empregando-se o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). O teste fundamenta-se na transferência de elétrons para os aceptores (como oxigênio, nitrato e sulfato), que ocorre durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos. A incorporação de um aceptor de elétron ao meio de cultura, no caso o DCPIP, possibilita averiguar a capacidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos como substrato. O resultado é confirmado com a mudança de cor de azul (oxidado) para incolor (reduzido). Esta técnica desenvolvida por Hanson et al. (1993) foi adaptada para aplicação em meio de cultura sólido.

Os isolados foram cultivados em caldo Malte 2% por 5 dias, sob agitação a 28°C. Posteriormente, 1,5 mL do inóculo foi transferido para uma placa de fundo reto de 96 poços. Por existirem espécie filamentosas, a inoculação foi realizada em poços alternados para evitar contaminação cruzada, resultando na utilização de 24 poços por placa.

Concomitantemente, placas de Petri 100 x 20 mm foram preparadas contendo o meio ágar Bushnell Haas (Difco™) acrescido com 1,6 mL de DCPIP (1 g/L) e 0,1 % de Tolueno, o qual foi utilizado como fonte de carbono. Posteriormente as placas receberam os inóculos cultivados com auxílio de um replicador. O ensaio foi feito em duplicata.

Em função da volatilidade e toxicidade do substrato, ressalta-se que as placas foram cuidadosamente vedadas e envoltas em papel alumínio devido à fotossensibilidade do indicador DCPIP e mantidas em dessecadores durante os experimentos. A atividade é considerada positiva mediante formação do halo incolor (reduzido) contrastante com a cor azul (oxidado).

5.2 Ensaio de Cromatografia Gasosa

5.2.1 Coleta do solo para microcosmo

Amostras de solo foram coletadas no jardim experimental da UNESP – Rio Claro, nas coordenadas 22°23'45.18"S 47°32'49.18"W (Figura 1)

O solo foi coletado de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1986), Norma Técnica NBR 6.457: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.

Figura 1- Área de coleta das amostras de solo, no Jardim experimental da UNESP, campus de Rio Claro.



Fonte: Próprio autor (2014)

5.2.2 Caracterização microbiológica do solo

A caracterização foi realizada mediante contagem das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g/ss), pela metodologia de diluição seriada do solo (CLESCERI; GREENBERG; EATON, 1998).

Preparou-se uma suspensão de 10g de solo em 90mL de solução salina esterilizada (0,85% de cloreto de sódio - NaCl) a qual foi deixada sob agitação por 10 minutos. Após esse período, procedeu-se a uma diluição decimal. Das diluições preparadas de 10^{-3} e 10^{-4} , uma alíquota de 1 mL foi inoculada em meios de cultivos apropriados, em triplicata, utilizando a Técnica em Profundidade (Pour Plate). Aos meios de cultivo para o crescimento de fungos foram adicionados os antibióticos

penicilina (11,5 uL/mL de meio) e cloranfenicol (1,92 uL/mL de meio) para que inibir o crescimento bacteriano.

Os meios utilizados foram: Plate Count Agar (PCA) para bactérias, Sabouraud para leveduras e Potato Dextrose Agar (PDA) para fungos filamentosos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Para quantificar a UFC/g/ss foi verificado o peso seco do solo mediante sua secagem em estufa 105°C por duas horas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL, 1984).

5.2.3 Preparo do solo

Para a montagem do experimento, o solo foi seco em bandejas sob a ação do sol, peneirado em malha 2,0 mm (ABNT) e posteriormente triturado. Foi realizada a medida da capacidade de campo (CC; adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996) e acertada a umidade para 70% da capacidade de campo.

5.2.3.1 Capacidade de Campo (CC)

O conteúdo de água presente no solo foi determinado. Para isso pesou-se cerca de $1 \pm 0,001$ g de substrato e em seguida foi colocado em estufa por 24 horas a $105 \pm 2^\circ\text{C}$. A umidade inicialmente presente no solo foi calculada pela diferença dos pesos (antes de depois da secagem em estufa).

Para avaliar a capacidade de campo foi adicionada água ao solo até sua saturação e depois de 24 horas foi pesado $1 \pm 0,001$ g do material encharcado para ser levado à estufa a 105°C por 24 horas e então pesado novamente seco. O cálculo da CC foi obtido pela diferença de peso entre o solo encharcado e o solo seco, a capacidade de campo demonstra a quantidade máxima de água necessária para saturar o material estudado.

5.2.3.2 Preparo do inóculo

As linhagens selecionadas, *Trichoderma* sp. e *Cladophialophora Psammophila* foram crescidas em meio Ágar-aveia e Malte 2% respectivamente, durante 10 dias, incubadas em estufa a 25°C . Posteriormente os inóculos foram acertados para

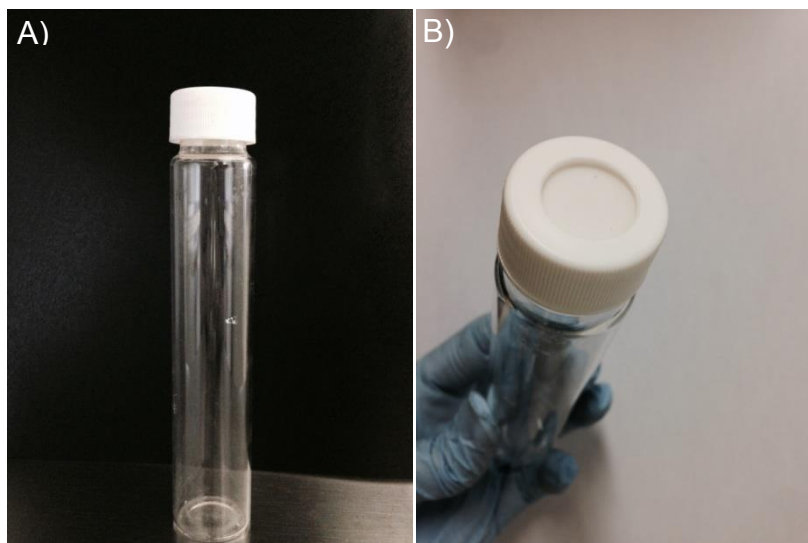
concentração de 10^6 em solução salina e então adicionados ao solo de acordo com os tratamentos (quadro 1).

5.2.4 Frasco utilizado

A cromatografia gasosa é um método que permite a avaliação da concentração de um composto em um sistema ao longo do tempo, sendo indicado para detecção da degradação de um composto. O problema de se trabalhar com os BTEX, especificamente o tolueno neste trabalho, reside em seu alto grau de volatilização, fato que dificulta manter um controle do hidrocarboneto no sistema que permita uma avaliação correta da degradação do composto. Essa característica exige um frasco que tenha uma eficiente vedação, e além disso, deve ser considerado seu tamanho, pois para se trabalhar com micro-organismos vivos é necessário um frasco de tamanho considerável, para maior disponibilização de oxigênio. Nesse contexto, recomenda-se os frascos de Boston acoplados a válvulas de politetrafluoretileno (teflon) tipo Mininert® (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2001), porém, tem custo elevado para ser obtido no Brasil, sendo economicamente inviável para experimentos que necessitam de grande número.

Em sua dissertação de mestrado BARON (2014) avaliou diferentes frascos e adaptações buscando uma alternativa mais econômica que desse suporte para as necessidades tanto do micro-organismo quanto da metodologia. Quatro projetos diferentes de frascos foram montados, e nenhum deles provou ser eficiente para o propósito desejado, demonstrando a dificuldade existente em experimentos como os pretendidos nesse trabalho.

No presente trabalho foi utilizado o frasco Vial clear, 60 mL, com septo de teflon da LA-PHA-PACK (Figura 2).

Figura 2 – Frascos utilizados para microcosmo

Fonte: Próprio autor (2014). A) Frasco 60 ml LA-PHA-PACK. B) Destaque para tampa com septo de teflon

5.2.5 Tratamentos realizados

Seis tratamentos foram realizados no ensaio para análises de cromatografia. Cada um com 3 repetições. Os tratamentos estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos tratamentos realizados no ensaio.

Tratamento	Solo	Estirpe fúngica
Controle Positivo 1	Esterilizado	<i>C. psammophila</i>
Controle Positivo 2	Nativo	<i>C. psammophila</i>
Controle Negativo	Nativo	-
Ensaio 1	Esterilizado	Linhagem selecionada
Ensaio 2	Nativo	Linhagem selecionada
Controle Abiótico	Esterilizado	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2014); (-) = ausência

O controle abiótico foi preparado para monitorar a possível perda de tolueno do sistema e o controle negativo para verificar a capacidade de degradação da microbiota nativa. Para o controle positivo foi utilizada a linhagem CBS 110553 *C. psammophila*, descrita na literatura por utilizar tolueno como fonte de carbono. Foi testada sua capacidade de degradação quando isolada de outros micro-organismos (solo estéril) e quando em consórcio (solo nativo). Os ensaios 1 e 2 utilizaram a linhagem

selecionada na triagem a partir do *screening* descrito no item 5.1, e os ensaios testaram seu comportamento em relação ao tolueno, em solo estéril e em solo nativo. Quando foi o caso, o solo foi autoclavado por 50 minutos a 120°C para esterilização. Foi adicionado tolueno 1% em 6 gramas de solo nos tratamentos descritos no quadro 1. Os inóculos preparados como no item 5.2.3.2 foram adicionados aos devidos tratamentos durante a montagem do experimento.

5.2.6 Análise da degradação de tolueno na amostra

Foram realizadas análises de cromatografia gasosa para a determinação dos índices de degradação do tolueno nas amostras a serem analisadas, incluindo os controles. O experimento foi efetuado na divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Paulínia, São Paulo, sob a supervisão do doutor Adilson Sartoratto, responsável pelas análises, utilização do equipamento de cromatografia e validação da metodologia. Os extratos obtidos, como descrito no item 5.2.6.2, foram analisados utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 acoplado a detetor seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975, utilizando-se He como gás de arraste, fluxo de 1 mL / min. A temperatura da coluna foi inicialmente 35°C, com velocidade de aquecimento 3°C/min e temperatura final de 65°C. A temperatura do injetor foi 220°C e do detector 250°C. O volume do extrato injetado foi de 1 µL.

5.2.6.1 Validação do método de extração de tolueno do solo

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, com a comparação, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, ele deve passar por uma série de avaliações denominado validação (RIBANI et al., 2004).

Estes estudos laboratoriais têm o objetivo de garantir a exatidão, seletividade, reprodutibilidade e robustez de um método dentro de uma faixa específica na qual o analito será analisado. Os principais parâmetros avaliados são exatidão, precisão, limite de detecção e de quantificação, linearidade e faixa linear. Os quais foram verificados neste trabalho.

5.2.6.1.1 Exatidão do processo de extração

O cálculo da exatidão mede a proximidade entre o valor obtido na análise e o valor esperado presente na amostra. Pode ser determinada de 3 formas: 1) com a análise de materiais certificados; 2) fazendo-se a comparação entre dois métodos, sendo um deles o método oficial ou de referência, e 3) e testes de recuperação, onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas à matriz amostra (processo conhecido como fortificação). Neste estudo foi realizado o teste 3, a recuperação, expressa em porcentagem, é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação, expressa pela equação 1.

$$\% \text{recuperação} = \frac{\text{concentração encontrada na amostra fortificada } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{concentração adicionada na amostra } (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100 \quad (1)$$

Primeiramente foi preparado um padrão de tolueno na concentração 2608 $\mu\text{g/mL}$ (65,2 mg de tolueno em balão volumétrico de 25 mL, com acetato de etila) e a partir desta solução, foram preparados os padrões de trabalho de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações dos padrões de tolueno utilizadas

$\mu\text{g/mL}$
130,4
260,8
521,6
782,4
1304,0
1825,6
2608,0

Fonte: Próprio autor (2014).

Foram também preparadas 3 concentrações (em triplicata) de amostras contendo 0,5, 1,0 e 1,5% de tolueno em água para serem avaliadas. Os padrões foram injetados no cromatógrafo a gás e os resultados foram colhidos e analisados.

5.2.6.1.2 *Exatidão do método de análise*

Da curva de calibração construída (média de 3 injeções), retirou-se o ponto intermediário, construiu-se uma nova curva com os pontos restantes e calculou-se o ponto retirado para verificar a eficácia do sistema envolvido, como equipamento, soluções utilizadas e curva obtida.

5.2.6.1.3 *Precisão*

A precisão representa o grau de dispersão entre resultados obtidos para uma mesma amostra, analisada repetidas vezes em condições idênticas. Ela pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (s_R), equação 2.

$$S_R = 100 \times s/X \quad (2)$$

onde: s_R = estimativa do desvio padrão relativo
 s = desvio padrão
 X = média dos valores

Os valores aceitáveis para a precisão podem ser estimados em função da concentração do analito na matriz, de acordo com a equação de Horwitz (equação 3).

$$S_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (3)$$

onde: C – concentração
 s_R – estimativa do desvio padrão relativo

Segundo a ANVISA, uma precisão aceitável apresenta um DPR abaixo ou próximo do limite superior de 5% (ANVISA, 2003). Foram realizadas 6 injeções das concentrações mínima, intermediária e máxima dos padrões preparados.

5.2.6.1.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser percebida, mas não necessariamente quantificada, com certo nível de confiança, utilizando um método analítico. A forma mais conveniente para o cálculo do LD é através da relação sinal/ruído (S/R). Este método pode ser aplicado somente em procedimentos onde o ruído da linha de base é mensurável e é feito pela comparação entre os sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do composto de interesse com um branco destas amostras. O LD é definido como a concentração de analito a partir da qual $S/R \geq 3$, sendo o resultado expresso como a concentração do analito na amostra.

O limite de quantificação (LQ) de um método representa a menor concentração de um analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser avaliado com a relação sinal/ruído, sendo reconhecido quando a concentração do analito possui $S/R \geq 10$.

Os limites de detecção (LD e quantificação (LQ) foram calculados através da relação sinal/ruído na região do cromatograma próxima ao pico do tolueno de menor concentração, considerando-se a relação 3:1 para LD e 10:1 para LQ.

5.2.6.1.5 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro de uma determinada faixa de concentração. A correlação entre o sinal medido e a concentração (ou massa) da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maioria dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração (ou massa) da espécie deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para amostras com concentrações (ou massas) conhecidas dessa espécie. Idealmente, esta relação pode ser expressa por uma reta chamada curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes descritivos dessas retas a partir de

um conjunto de medições experimentais pode ser feita usando o método conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes angular a e linear b , também é possível definir o coeficiente de correlação r . Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003).

5.2.6.1.6 Faixa linear

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de concentração (ou massa) da espécie analisada. Este intervalo no qual se pode construir uma curva analítica linear é chamada de faixa linear dinâmica, que é a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante.

5.2.6.2 Extração dos analitos

Primeiramente foram montados 72 tubos (60 mL), previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120°C e identificados com os respectivos tratamentos. Então foram adicionados a cada tubo 6 gramas de solo, esterilizado ou não, de acordo com os tratamentos (Quadro 1). Os inóculos preparados de acordo com o item 5.2.3.2, e o tolueno (1%) foram adicionados aos tubos previstos, os quais foram então devidamente fechados e vedados. Após, 3 tubos de cada tratamento foram preparados para a análise de cromatografia gasosa, para obtenção da concentração de tolueno nos tempos 0, 7 dias, 14 dias e por fim 21 dias depois (T0, T7, T14 e T21), as triplicatas eram sacrificadas a cada medida. Este procedimento foi realizado segundo protocolo adaptado de Souza (2005). Foram adicionados 6 gramas de óxido de cálcio e 30 mL de álcool isopropílico aos tubos, submetidos a agitação manual para mistura de fases e posteriormente foram agitados mecanicamente em shaker por 30 minutos. Então, esperou-se a separação de fases e foi coletado 1 mL do sobrenadante, o qual foi filtrado em membrana Millipore 0,45 mm com auxílio de seringa, depositado em vials de leitura cromatográfica e enviados para análise.

5.3 Preservação das linhagens utilizadas

5.3.1 Ultracongelamento a -80 °C

Microtubos de 2mL foram devidamente identificados com o código dos isolados, adicionados 300 µL de malte 2% caldo e inoculados. Esse material foi incubado por 7 dias a 25°C. Após, foi adicionado o crioprotetor, 300 µL de glicerol 30% (concentração final de 15%) e agitou-se vigorosamente em vórtex por 10 s e então adicionou-se 12-15 pérolas de vidro (0,2 - 0,3 mm de diâmetro), para servirem como suporte para o micro-organismos. Os microtubos foram a seguir colocados a -20°C por no mínimo duas horas e então acondicionados em caixas plásticas no interior de ultracongelador a -80°C (modificado de CBS, 2010).

5.3.2 Método de Castellani

Os isolados foram inoculados em meio de cultura PDA. Após o crescimento satisfatório da cultura, blocos de ágar (4 a 6 mm³) contendo o micélio fúngico, foram transferidos, com o auxílio de um bisturi esterilizado, para tubos contendo de 10 a 15 mL água destilada esterilizada, devidamente identificados. A seguir foram mantidos a 4 °C (CASTELLANI, 1939).

5.4 Identificação dos isolados

5.4.1 Análise morfológica

A caracterização morfológica das culturas foi feita mediante observações macro e microscópicas com o auxílio de estereomicroscópio e preparação de lâminas para microscopia óptica a partir da técnica de microcultivo. Para tal, o meio de cultura foi vertido em placa com 0,5 cm de espessura e após solidificado, cubos de 10 x 10 mm foram recortados e deixados sobre o meio de cultura, inoculados e cobertos com uma lamínula de 20 x 20 mm (Corning) esterilizada. A placa foi fechada e incubada a 25°C (CROUS et al., 2010). Decorridos de três a quatro dias o sistema foi aberto, retiraram-se as lamínulas e as mesmas foram colocadas sobre lâminas contendo uma gota de ácido láctico ou azul de lactofenol, para serem analisadas sob microscópio óptico.

5.4.2 Análise molecular

5.4.2.1 Extração do DNA genômico

5.4.2.1.1 Leveduras

Microtubos de 1,5 mL foram identificados com o código da cultura, adicionados com 500 µL de solução de lise esterilizada, e o equivalente a 100 µL de micro-esferas de vidro (Sigma) autoclavadas por 15 minutos a 121°C. Micélio/células com até 10 dias de crescimento foram adicionadas e agitadas vigorosamente em vórtex por 4 minutos, buscando a quebra das células para liberação do DNA. Após, os tubos foram colocados em banho-maria por 1 hora a 65°C. Os procedimentos de agitação e aquecimento em banho-maria foram repetidos mais duas vezes e, depois disso, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, recuperou-se a fase aquosa (aproximadamente 400 µL), que contém o DNA, em novos tubos esterilizados previamente marcados, os quais foram armazenados à temperatura de -20°C (modificado de Sampaio et al., 2001 e Almeida, 2005).

5.4.2.1.2 Fungos filamentosos

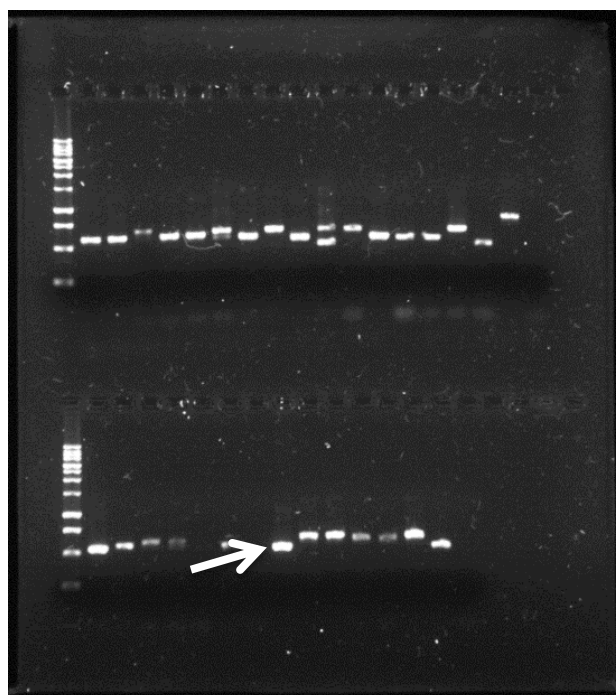
Foi utilizado o método de extração com CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio), modificado de Moller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). Em microtubos de 1,5 mL foram adicionadas esferas de vidro e 500 µL de tampão de lise (TES) esterilizados e então adicionou-se o fungo. Posteriormente 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) foi adicionada e a mistura foi agitada por 4 minutos no vórtex, incubada a 65° C durante 30 minutos e agitada novamente durante 4 minutos. Em seguida 140 µL de NaCl 5M e 64 µL de CTAB 10% foram colocados nos microtubos, os quais foram invertidos manualmente 25 vezes e mantidos a 65° C por 60 minutos. Após homogeneizou-se a mistura no vórtex por 4 minutos e foi centrifugada a 10.000 RPM durante 30 segundos. Adicionou-se 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e inverteram-se os microtubos durante 5 minutos para então centrifugá-los a 12000 RPM durante 10 minutos. Novos tubos foram preparados para coletar o sobrenadante resultado da centrifugação, após foram adicionados 300 µL de isopropanol 100% gelado e 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e invertidos os microtubos 25 vezes. Novamente foram

centrifugados a 10.000 RPM durante 10 minutos e o isopropanol foi removido por inversão única dos microtubos. Após foi adicionado 600 μ L de etanol 70% gelado e os tubos foram centrifugados a 10.000 RPM durante 10 minutos para a seguir remover o etanol também por inversão única. Os microtubos foram deixados em repouso overnight na bancada e posteriormente adicionou-se 30 μ L do tampão TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM), agitou-se no vórtex e centrifugou a amostra. O DNA extraído foi estocado a -20°C para posterior sequenciamento.

5.4.2.2 Eletroforese

Produtos de extrações, ampliações e purificações foram caracterizados em gel de agarose 1% para conferir a qualidade do procedimento. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal, onde foi adicionada a solução de tampão TBE 1X mais agarose 1%. Antes de verter a solução na cuba, adicionou-se diretamente ao gel, na concentração 1 μ L/100 mL de gel, solução de Sybr Green para coloração. Foi utilizado como padrão um marcador de massa molecular (ladder) de 1 Kb. A corrida foi realizada a 100V e 50 mA por 40 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador e fotografado (figura 3).

Figura 3 – Fotografia do gel de eletroforese



Fonte: Próprio autor (2014). Seta indica banda do gel com DNA.

5.4.2.3 Amplificação do DNA ribossomal – PCR

Para o sequenciamento foi realizada a amplificação da região ITS do DNA ribossomal a partir das amostras de DNA genômico. Para isso, um mix de reagentes foi preparado como indicado na tabela abaixo.

Tabela 2 - Reagentes para o MIX de PCR para amplificação da região ITS

Reagentes	Concentração solução estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (25 µL)
Solução tampão da Taq	10 X	1 X	5,0 µL
Solução de MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
<i>Primer reverse</i>	20 µM	0,4 µm	1,0 µL
<i>Primer forward</i>	20 µM	0,4 µm	1,0 µL
dNTP's	25 µM	200 µm	0,4 µL
Taq DNA-polimerase	5 U/µL	2U	0,4 µL
DNA	-	50-100 ng	5,0 µL
Água ultrapura	-	-	10,7 µL

Fonte: Elaborado pelo autor (2014)

Em tubos de PCR (0,2 mL) primeiro a água e o tampão foram misturados, em seguida o dNTP e os *primers* e por último a *Taq polimerase* e o DNA a ser amplificado. Posteriormente os tubos foram colocados no termociclador (modelo Hybaid Spring). Os *primers* utilizados para amplificação do DNA ribossomal dos fungos foram específicos para região ITS1-5,8S-ITS e região D1/D2.

O programa de amplificação utilizado foi: 1 ciclo de 94°C/ 2 min seguido de 30 ciclos a 94°C/30 seg, 55°C/ 30 seg, 72°C/ 1 min e 1 ciclo a 72° por 10 min. Ao final dos ciclos um estágio hold a 4°. Para verificação dos produtos de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% como realizado para verificação da extração do DNA genômico.

5.4.2.4 Purificação dos produtos da Amplificação (PCR)

Posterior à verificação da qualidade dos produtos formados na amplificação, as amostras foram purificadas, utilizando-se o kit “Illustra GFX PCR DNA and gel band

purification kit”, da GE Healthcare®. Em um tubo coletor (2 ml) identificado com o número da amostra, foi colocada uma coluna GFX, onde foi adicionado 500 µL de *capture buffer* mais DNA (100 µL), então a solução foi homogeneizada. As amostras foram centrifugadas (12.000 x g) por 1 minuto, e a solução contida no tubo coletor foi descartada. Foi adicionado 500 µL de Wash Buffer à coluna e foram novamente centrifugadas e deixadas em repouso por 1 min. A coluna GFX foi então transferida à novo tubo, ao qual foi adicionado 30 µL de água Milli-Q autoclava. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 2 minutos e posteriormente centrifugados por 2 minutos à 12.000 x g, para recuperar o DNA purificado. As amostras puras resultantes foram aplicadas em gel de agarose 1% para nova checagem.

5.4.2.5 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi feita utilizando o kit Big Dye da Life Technologies. Foi realizada em uma placa de 96 poços previamente banhada em UV compatível com o sequenciador ABI 3500 xl. Em cada reação foi adicionado 6 µL de água para PCR, 2 µL do tampão Save Money (Tris-HCl e MgCl₂), 0,5 µL do primer a (5µM), 0,5 µL de Big Dye (Life Technologies) e de 0,5-3,0 µL de DNA (10-20 ng/µL), totalizando 10 µL. O Big Dye é um reagente sensível à luz e à temperatura, portanto foi mantido fora do freezer o mínimo possível. Após o termino da ciclagem no Termociclador a reação foi armazenada a -20°C e protegida da luz para posterior precipitação e aplicação no sequenciador.

As seqüências resultantes foram editadas utilizando-se o software BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 1999), e as seqüências consensus obtidas foram analisadas com o uso do aplicativo BLASTn disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information) que compara a seqüência apresentada às seqüências depositadas no GenBank.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

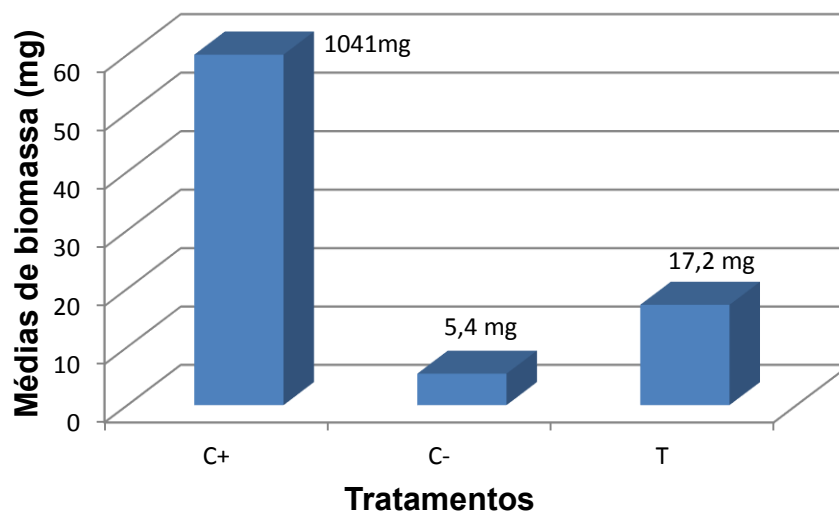
6.1 Triagem

6.1.1 Teste em dessecadores com atmosfera saturada em tolueno

O resultado de produção de biomassa dos 50 isolados analisados encontra-se no apêndice A, e a média dos crescimentos pode ser observado no gráfico 1.

O teste realizado apresentou resultados positivos para os isolados testados, visto que os valores médios de biomassa encontradas nos tratamentos foram os esperados. O controle positivo apresentou crescimento superior aos demais tratamentos, com média de 1,041g ($\pm 0,28$ g) de produção de biomassa, esse resultado pode ser atribuído ao fato da glicose ser um monossacarídeo, de fácil absorção celular e também demonstra que todos os inóculos estavam viáveis. No controle negativo os fungos demonstraram baixo crescimento, em média de 0,005g ($\pm 0,009$ g), o que foi compreensível devido a ausência de fonte de carbono e energia do meio, este crescimento, apesar de pequeno, ocorreu provavelmente pelo uso da reserva de carbono normalmente encontrada no inóculo. Os isolados, quando submetidos ao tratamento com tolueno, demonstraram crescimento superior ao tratamento sem fonte de carbono, com média de 0,016g ($\pm 0,001$ g) de biomassa produzida, o que indica que esses micro-organismos foram capazes de utilizar o tolueno como fonte de carbono.

O crescimento desses isolados na presença de tolueno demonstra que os mesmos assimilam e são tolerantes à toxicidade da molécula, característica desejada em micro-organismos selecionados para biorremediação. Nesse aspecto, a técnica demonstrou-se muito satisfatória para essa triagem de fungos, pois foi capaz de evidenciar a tolerância e utilização do tolueno como fonte de energia, visto que apresentaram média de biomassa cerca de 3 vezes superior ao tratamento sem fonte de carbono, como está demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Produção média (n=50) de biomassa.

Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Tratamento com tolueno (T), controle negativo(C-) e controle positivo (C+)

Foram selecionados, a partir dessa primeira triagem, 24 fungos com melhores resultados para o próximo ensaio em placa, como listados na tabela 3.

Tabela 3 - Fungos selecionados e respectivos valores de biomassa seca.

LMA	Biomassa produzida (mg)			LMA	Biomassa produzida (mg)		
	C+	C-	T		C+	C-	T
578	0,372	0,003	0,016	171	0,947	0,003	0,016
917	1,188	0,003	0,017	411	1,192	0,004	0,017
920	0,531	0,056	0,016	413	1,296	0,003	0,016
922	0,481	0,003	0,017	602	1,047	0,004	0,017
931	1,199	0,003	0,018	611	1,102	0,004	0,017
927	1,261	0,003	0,015	764	1,087	0,004	0,016
268	1,262	0,004	0,016	656	0,982	0,003	0,017
34	1,152	0,003	0,017	707	0,997	0,004	0,017
41	1,19	0,004	0,016	708	1,043	0,004	0,017
84	0,712	0,003	0,017	760	0,816	0,004	0,016
102	0,653	0,003	0,016	763	0,829	0,034	0,016
144	0,725	0,004	0,016	767	1,261	0,004	0,017

Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Controle positivo (C+), negativo (C-) e tratamento com tolueno (T). LMA = Laboratório de Meio Ambiente.

6.1.2 Triagem em placas para ensaios de biodegradação de tolueno.

Nesse segundo método de triagem foram testados os isolados listados na tabela 3. Na figura 4, onde registrou-se os diâmetros dos halos de degradação, verificou-se que dos 24 fungos, 5 apresentaram formação de halo mostrando capacidade de degradação do tolueno, 10 apresentaram crescimento no meio adicionado tolueno, mas sem formação de halo, indicando apenas tolerância ao composto, e não degradação. Os diâmetros da biomassa e halos formados estão dispostos na tabela 4. O demais fungos não apresentaram crescimento.

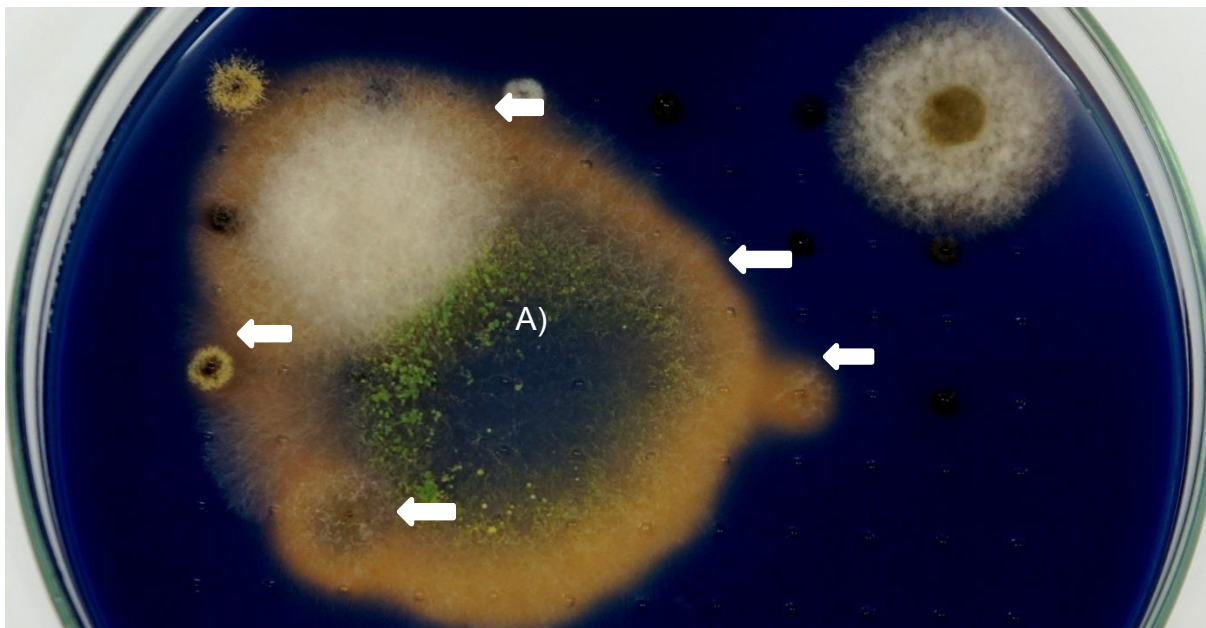
Tabela 4 – Medidas em cm de formação halo e biomassa no meio contendo DCPIP.

Isolados(LMA)	Diâmetro (cm)	
	Halo	Biomassa
578	1,5	1,5
917	3,3	3,3
920	0,5	0,5
268	6,0	6,0
41	0,6	1,0
922	-	0,8
931	-	0,4
84	-	2,8
411	-	0,4
764	-	0,3
656	-	0,35
708	-	0,4
760	-	0,3
763	-	0,4
767	-	0,35

Fonte: Elaborado pelo autor (2014). (-) ausência. LMA = Laboratório de Meio Ambiente.

Dentre os isolados com resultado positivo para degradação, o fungo 454A (figura 4, letra A), identificado como *Trichoderma* complexo *koningii*, foi selecionado para o ensaio de cromatografia gasosa, pois apresentou maior crescimento da colônia e formação de halo, com 6,0 cm de diâmetro. Indicando alta tolerância ao composto tóxico e potencial degradação do tolueno.

Figura 4 - Placa demonstrando mediante halo incolor a tolerância e biodegradação do tolueno pelos fungos testados.



Fonte: Autor (2014). Halos estão indicados pelas setas. Letra (a) indica o fungo 454A.

6.2 *Trichoderma complexo koningii*

A espécie *Trichoderma koningii* foi descrita em 1902 por Oudemans e Koning, e desde então tem sido uma das espécies mais citadas de *Trichoderma* Pers (Hypocreales, Hypocreaceae). Em relação a degradação de hidrocarbonetos, Wu e colaboradores (2010) demonstraram alta eficiência de remoção de BTEX pela linhagem de *Trichoderma* sp. O gênero é mencionado como capaz de degradar hidrocarbonetos presentes em petróleo bruto (SINGH, 2006), o que também suporta investigações para seu uso em biorremediação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados.

Sabe-se contudo que a maioria dos trabalhos relatam o envolvimento de diversas espécies de *Trichoderma* principalmente no controle de doenças de plantas causadas por outros fungos. Em um deles, WORASATIT et al. (1994) relataram a produção de 6-pentil-alfa-pirona por *T. koningii*, um inibidor de germinação de esporos. SONG et al. (2006), caracterizou “trichokonins” nesse micro-organismo que são peptaibols (antibióticos de 5-20 aminoácidos) com atividade antimicrobiana. A literatura revela o papel de *T. koningii* em muitas atividades, por exemplo, filtrados de culturas *T. koningii* e *T. harzianum* mataram 100% dos nematóides de galha em Sri Lanka (SANKARANARAYANAN et al., 1997). Gava e Menezes (2012) demonstraram

que *T. koningii* apresentou potencial para uso no controle biológico de patógenos de solo do meloeiro no Vale do São Francisco. SILVA et al (2012) demonstraram a produção de quitosanase por esta linhagem, uma enzima que sintetiza oligômeros a partir de glucana como fonte de carbono, e tem aplicação na indústria farmacêutica e de química fina. O fungo também beneficia a saúde das plantas e consumo de nutrientes, é altamente ativo na biomineralização de cristais de oxalato de cálcio no solo (OYARBIDE; OSTERRIETH; CABELLO, 2001).

A produção de antibióticos como dermadin e trichoviridin por *T. koningii* já foi relatada (TAMURA; KOTANI; NARUTO, 1975), assim como a produção de antifúngicos como o ácido koningico (ENDO; KANBE, 1981; ENDO et al, 1985). Halliwell (1965), apud Wood (1968), mostrou a capacidade de solubilização de celulose nativa, na forma de fibras de algodão, por *T. koningii*.

Até o momento a espécie *Trichoderma koningii* ainda não foi descrita como possível degradador de tolueno, porém seu amplo espectro enzimático e os resultados apresentados neste estudo incentivam o aprofundamento nessa direção.

6.3 Solo para ensaio de Cromatografia gasosa

6.3.1 Análise físico-química

O solo coletado em triplicata foi analisado no Departamento de Solos e Adubos da Unesp de Jaboticabal, SP. Os resultados estão registrados nos anexos A e B.

6.3.2 Análise microbiológica

A quantificação de número de micro-organismos encontrado no solo está registrado na tabela 5. Verificou-se que o solo tinha 0,17 g de água e seu peso seco corresponde a 0,83g, valor utilizado para o quantificar o UFC/g/ss (Tabela 5). Os valores registrados demonstraram alta abundância microbiana no solo amostrado, qualidade importante para o presente estudo.

Tabela 5. Número (10^4) de UFCs em meios de cultivo diferentes.

Amostra	PDA	PCA	SAB
1	5	54	9
2	10	62	6
3	5	41	6
Valor médio	6,67	52	7
UFC/g/ss	8,03	63,05	8,43

Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Meios PDA (Potato Dextrose Agar), PCA (Plate Count Agar) e SAB (Sabouraud).

6.3.3 Cálculo da Capacidade de Campo

Primeiramente foi calculada a umidade inicial do solo, para que fosse possível determinar o quanto de solução teria de ser adicionada ao solo para que sua saturação atingisse 70%. A umidade inicial encontrada foi de 12%, valor obtido a partir da média entre 3 réplicas. Posteriormente, calculou-se a quantidade máxima que o solo suporta até sua saturação completa, o valor obtido entre 3 réplicas foi 46%, dessa maneira, para calcular a capacidade de campo, é necessário subtrair o valor de umidade inicial pelo valor de umidade máxima, obtendo então a quantidade necessária de solução para atingir 100% de umidade.

A partir do conhecimento destes valores foi possível calcular quanto de solução é necessária para atingir 70% de saturação do solo, que resultou em 0,24 ml/g de solo.

6.4 Validação do método analítico

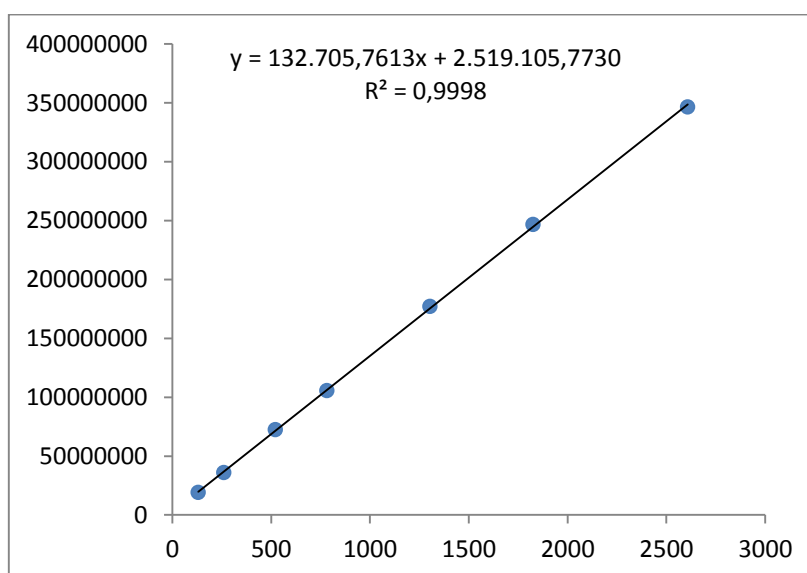
6.4.1 Exatidão

Os padrões foram injetados no cromatógrafo a gás, obtendo-se os valores de integração demonstrados na tabela 6. Com esses resultados construiu-se uma curva analítica (curva de calibração) (gráfico 2)

Tabela 6 – Valores de integração de acordo com os padrões

Conc. (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média
130,4	20080248	19038213	18717826	19278762
260,8	35127119	36084987	36552657	35921588
521,6	72745441	72998911	71909210	72551187
782,4	103806067	105129487	108174696	105703417
1304,0	177110820	175058564	179511900	177227095
1825,6	245507168	247867681	246741472	246705440
2608,0	342467487	348625323	348772091	346621634

Fonte: Próprio autor (2014).

Gráfico 2 – Curva de calibração dos padrões de tolueno

Fonte: Próprio autor (2014).

A tabela 6 e o gráfico 2 demonstram que concentrações entre 130,4 µg/mL e 2608,0 µg/mL resultarão em uma resposta proporcional. O coeficiente de determinação (R^2) indica, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto maior o R^2 (0 a 1), mais explicativo é o modelo, melhor ele se ajusta à amostra. Nesse caso, o R^2 é 0,9998, isto significa que 99,98% da variável dependente consegue ser explicada pelos regressores presentes no modelo.

6.4.2 Exatidão do processo de extração

As injeções das amostras teste com 0,5, 1,0 e 1,5% de tolueno, resultaram nos valores descritos na tabela 7. Os resultados comprovam que o método utilizado para extração e para análise do analito é confiável. Visto que para a extração os resultados mostrados na tabela 7, a média encontrada de recuperação foi 71% e segundo o INMETRO (2003), assume-se aceitável uma recuperação maior ou igual 80 %, com desvio de 15%, diminuindo para 68%. Assim, o valor encontrado de recuperação por essa metodologia pode ser considerado suficiente. Fatores como o alto grau de volatilidade do analito facilita perdas durante a manipulação do sistema no qual se encontra, o que torna compreensível uma recuperação não tão eficiente e ainda, segundo ANVISA (2003), se o método obtiver boa precisão, pode ser aceitável baixas recuperações (item 6.4.4).

Tabela 7 – Valores em µg/mL de recuperação de tolueno

Amostra (%)	Área	Conc.	Conc. Média	Recuperação (%)
0,5 (1)	80118334	584,75	590,81	59,08
0,5 (2)	82878518	605,55		
0,5 (3)	79770589	582,13		
1,0 (1)	202998153	1510,7	1549,84	77,49
1,0 (2)	206165078	1534,57		
1,0 (3)	215413523	1604,26		
1,5 (1)	288465719	2154,74	2312,06	77,07
1,5 (2)	324316478	2424,89		
1,5 (3)	315246852	2356,55		
Média	199485916	1484,237778	2312,06	71,21

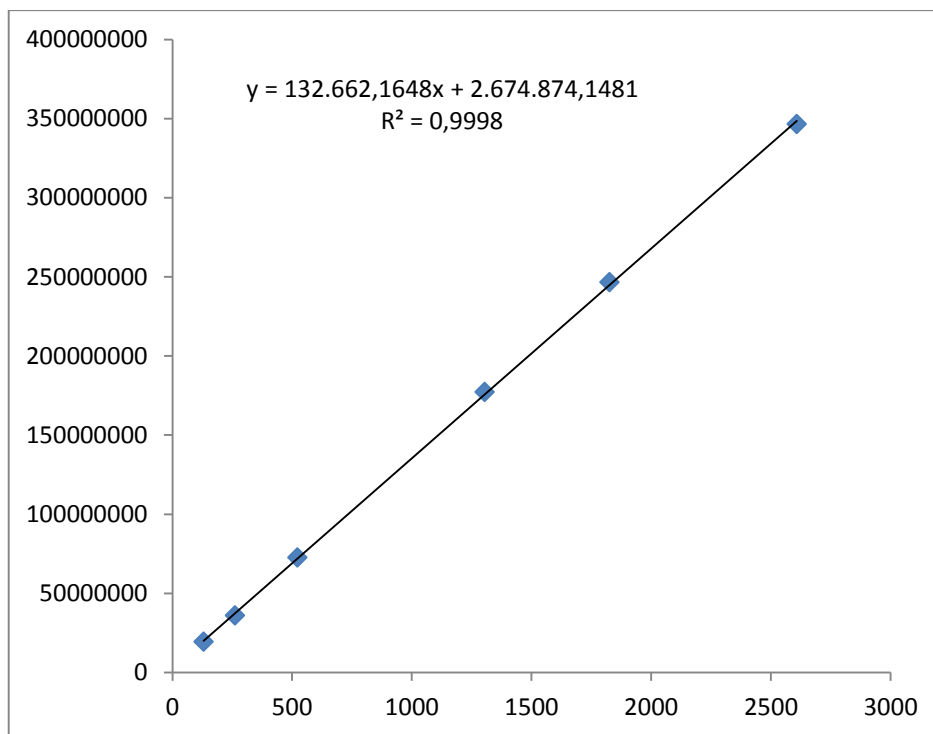
Fonte: Próprio autor (2014)

6.4.3 Exatidão do método de análise

Para a obtenção do grau de exatidão do método de análise, foi retirado da curva de calibração construída (gráfico 2) o ponto intermediário (782,4 µg/mL) (tabela 6) e construiu-se uma nova curva com os pontos restantes e calculou-se o ponto retirado (gráfico 3 e tabela 8), para verificar a aproximação do ponto encontrado com o ponto

calculado. A análise do analito demonstrou possuir alta exatidão, $99,3 \pm 2,2$, como pode ser observado na tabela 8, o que reforça a confiabilidade do método.

Gráfico 3 - Curva de calibração sem o ponto médio (782,4 µg/mL).



Fonte: Próprio autor (2014)

Tabela 8 – Cálculo do ponto médio a partir da curva de calibração

Valor esperado (µg/ml)	Área obtida	Valor calculado (µg/mL)	Exatidão (%)
782,4	103806067	762,3	97,4
	105129487	772,3	98,7
	108174696	795,3	101,6
	Média	776,63	99,3 ± 2,2

Fonte: Próprio autor (2014)

6.4.4 Precisão (repetibilidade)

Foram realizadas 6 injeções das concentrações mínima (130,4 µg/mL), intermediária (782,4 µg/mL) e máxima (2608,0 µg/mL) dos padrões preparados para obtenção da média, desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo (Sr). O S mede a

variabilidade dos valores à volta da média e o Sr é a relação entre o desvio absoluto e a média. Os resultados estão expostos na tabela 9. O Sr da menor concentração aplicada demonstra que houve maior variação entre os valores obtidos do que nas outras concentrações, o que sugere maior precisão por parte da metodologia para análise de concentrações mais altas. Assim sendo, segundo a ANVISA a precisão é aceitável em todas as situações, pois apresenta um Sr abaixo ou próximo de 5% (ANVISA, 2003).

Tabela 9 – Precisão metodológica para diferentes concentrações em µg/ml de analito

Replicata	Resultados em área		
	130,4	782,4	2608,0
1	20080248	103806067	342467487
2	19038213	105129487	348625323
3	18717826	108174696	348772091
4	19882606	106752583	347338905
5	21258772	106501701	352251736
6	21109393	107159016	350291112
Média	20014510	106253925	348291109
Desvio padrão (s)	1039540	1554025	3312125
Desvio padrão relativo (SR, %)	5,19	1,46	0,95

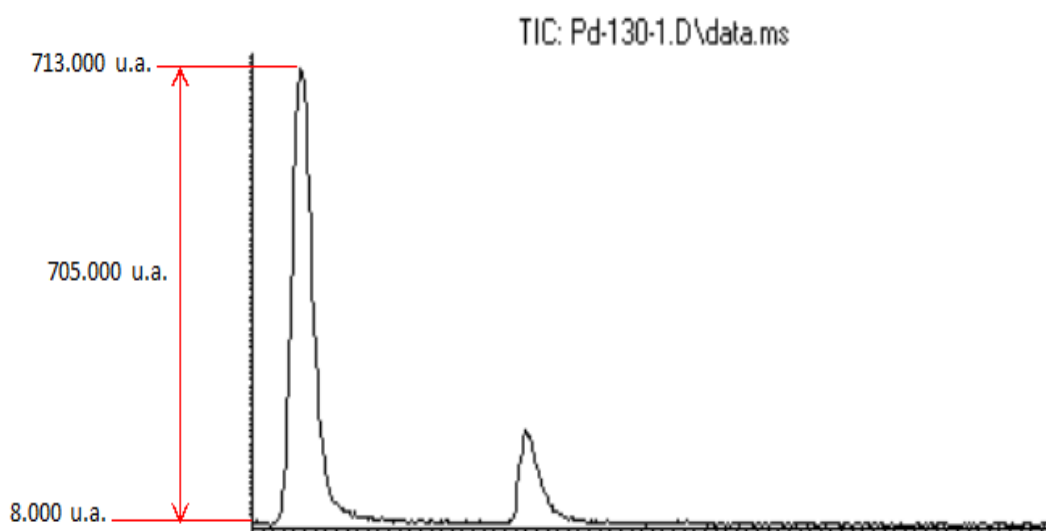
Fonte: Próprio autor (2014)

6.4.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando a relação sinal/ruído na região do cromatograma próxima ao pico do tolueno de menor concentração (130,4 µg/mL), considerando-se a relação 3:1 para LD e 10:1 para LQ. Segundo medidas tomadas no gráfico (gráfico 4 e 5), a abundância do padrão (130,4 µg/mL) resultou em 705.000 unidades de área e a abundância do ruído em 4.400 unidades de área. Seguindo uma regra de três simples, a concentração de tolueno encontrada no ruído seria 0,81 µg/mL. Assim, o limite de detecção resultou em 2,43 µg/ml ($3 \times 0,81$) e o limite de quantificação em 8,10 µg/mL ($10 \times 0,81$). Ou seja, a concentração mínima que é reconhecida como um pico é 2,43 µg/mL, porém a concentração a partir da qual a metodologia da segurança para quantificar é 8,10

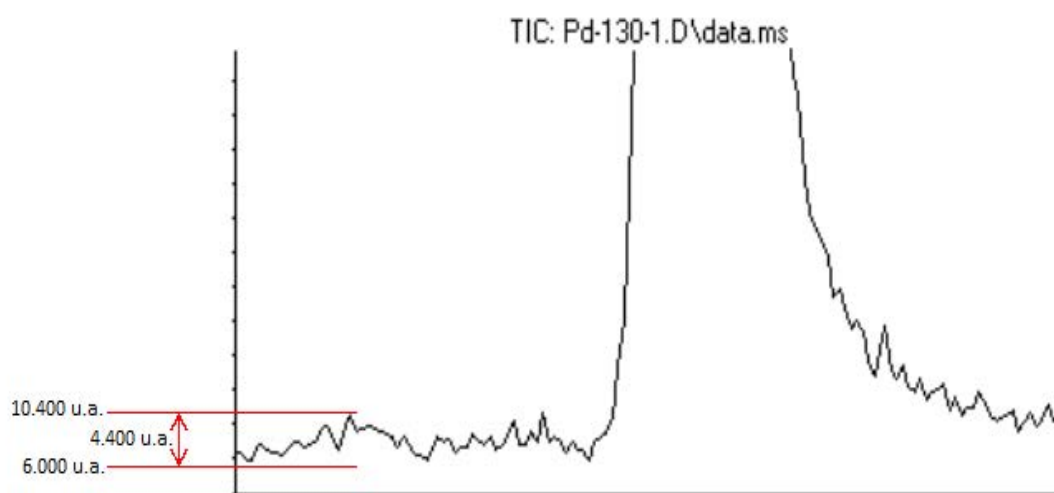
µg/ml. Valores de sensibilidade suficientes para o estudo em desenvolvimento, o qual utiliza concentrações expressivamente maiores.

Gráfico 4 – Padrão 130,4 µg/ml



Fonte: Próprio autor (2014)

Gráfico 5 – Ruído



Fonte: Próprio autor (2014)

6.4.6 Linearidade e faixa linear

A equação da reta encontrada com a curva de calibração pode ser observada na equação 4.

$$Y = 132.705,7613 X + 2.519.105,7730 \quad (4)$$

O coeficiente de correlação (R^2) foi igual 0,9998, resultado aceitável, visto que um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003). O método, portanto pode ser considerado capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro da faixa linear encontrada de 130,4 µg/mL a 2608 µg/mL, que é a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante.

6.5 Cromatografia

Os tratamentos descritos no quadro 1, foram denominados de acordo com a esterilidade do solo e o fungo adicionado, para facilitar o andamento do experimento. Denominação pode ser observada no quadro 2.

Quadro 2 - Tratamentos realizados no ensaio

Tratamento	Solo	Estirpe fúngica
ECP	Esterilizado	<i>C. psammophila</i>
NCP	Nativo	<i>C. psammophila</i>
N	Nativo	-
ET	Esterilizado	<i>Trichoderma cf. koningii</i>
NT	Nativo	<i>Trichoderma cf. koningii</i>
E	Esterilizado	-

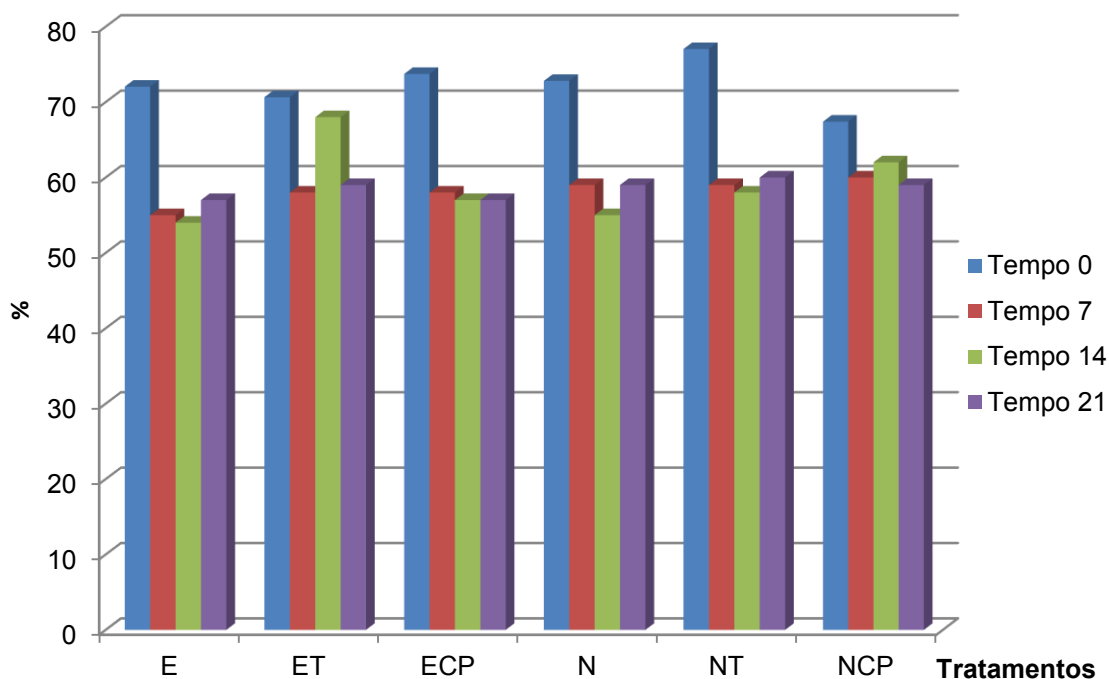
Fonte: Elaborado pelo autor (2014); (-) = ausência; ECP = Solo esterilizado com *C. psammophila*; NCP = Solo nativo com *C. psammophila*; N = Somente solo nativo; ET = solo esterilizado com *Trichoderma cf. koningii*; NT = solo nativo com *Trichoderma cf. koningii*; E = somente solo estéril

Tabela 10 - Concentração média de tolueno presente nos tratamentos durante o experimento.

Tratamentos	Concentração média (µg/mL)			
	T0	T7	T14	T21
E	1441	1101	1084	1142
ET	1413	1163	1156	1184
ECP	1474	1156	1133	1144
N	1456	1183	1108	1176
NT	1541	1188	1160	1207
NCP	1348	1208	1237	1177

Fonte: Elaborado pelo autor (2014). Tempo em dias: 0 (T0), 7 (T7), 14 (T14) e 21 (T21).

Gráfico 6 – Recuperação média de tolueno em µg/ml da amostra



Fonte: Elaborado pelo autor (2014)

Os resultados elucidados na tabela 10 e no gráfico 6, registram a concentração média de tolueno (µg/mL) em cada tratamento no período de 21 dias de análise. Como foi adicionado ao sistema 1% do hidrocarboneto em 6 gramas de solo, ou seja 60 µl de tolueno, e o mesmo foi suspenso em 30 mL de álcool isopropílico, esperava-se no tempo 0 uma concentração próxima a 2000 ug/mL, 100%. Como pode ser observado no gráfico 6, nesse experimento foi atingido no tempo 0 em média, 72% de recuperação, valor que é considerado como aceitável para análise deste tipo de

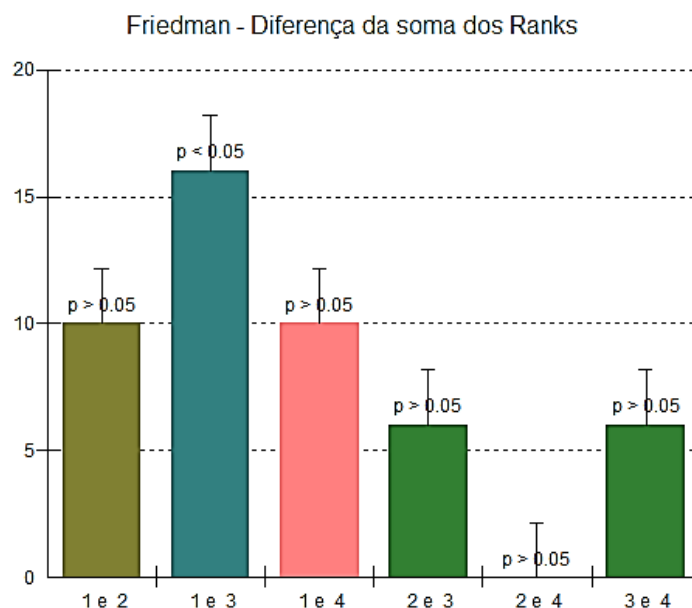
composto (ANVISA, 2003). Nos seguintes dias os valores se mantiveram com cerca 58,5% de recuperação, sendo que a maioria das diferenças encontradas eventualmente não apresentaram significância estatística, segundo o teste de Friedman aplicado empregando-se o software BioEstat (AYRES et al., 2007).

Os resultados do teste de Friedman estão representados nos gráficos 7 e 8, quando o $p < 0,05$ quer dizer que as diferenças são significantes. Este teste foi escolhido, pois os resultados são relacionados entre si, possuem dependência. Também é um teste adequado para o experimento em questão, que não proporcionou dados abundantes, o que traria resultados não confiáveis com a aplicação de outros testes, porém traz informações importantes para o trabalho.

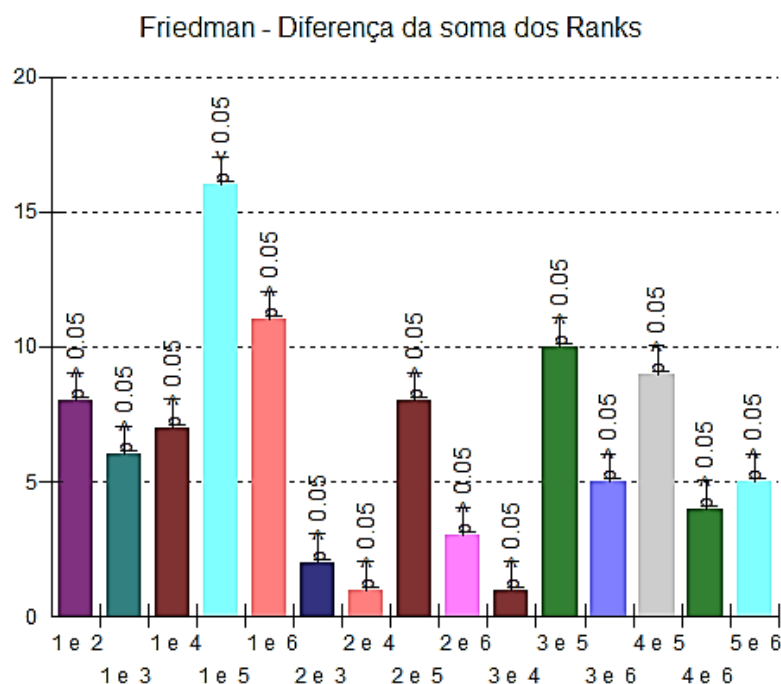
O gráfico 6 registra maior decaimento da concentração de tolueno entre os tempos 0 e o 7, que não foi considerada significativa pelo teste citado (gráficos 7 e 8). Os resultados obtidos também demonstram que não houve perda relevante de tolueno entre T0 e T21, o que demonstra sua eficácia em manter a concentração do tolueno, característica de muito valor, pois confirma a aplicabilidade do frasco. Este resultado pode significar que os micro-organismos utilizados e a microbiota do solo não foram capazes de degradar o composto. Outra hipótese é de que a concentração utilizada (1%) foi muito alta e tóxica para os micro-organismos antes que eles tivessem tempo para se adaptar. Trabalhos anteriores utilizaram de 0,02% a 0,4% de tolueno (PRENAFETA-BOLDÚ, 2004).

É importante ressaltar que a linhagem utilizada como controle positivo de degradação, *C. psammophila*, não influenciou nos resultados para que houvesse maior decaimento do hidrocarboneto, o que corrobora com a hipótese que a concentração de tolueno utilizada pode ter sido alta. As questões aqui levantadas sugerem a importância do experimento ser repetido sob concentrações mais baixas de tolueno, provavelmente 0,02 e 0,2%.

Os resultados que apresentaram diferença significativa foram entre o tempo 0 e o tempo 14 (gráfico 7) ($p = 0,0143$) e entre os tratamentos E (solo estéril) e NT (solo nativo com *Trichoderma cf. koningii*) ($p = 0,0455$), como exposto no gráfico 8. Com a repetição do experimento em mais duas concentrações, a capacidade de degradação de tolueno pelo fungo selecionado e o tempo em que isto acontece poderão ser confirmados, uma vez que os resultados obtidos até o momento não puderam ser conclusivos.

Gráfico 7 – Avaliação estatística dos tempos experimentais em dias

Fonte: software BioEstat (AYRES et al., 2007). Foi avaliada a significância dos valores encontrados entre os tempos 0 (1), 7 (2), 14 (3) e 21 (4). $P < 0,05$ indica diferenças significantes.

Gráfico 8 - Avaliação estatística dos tratamentos utilizados.

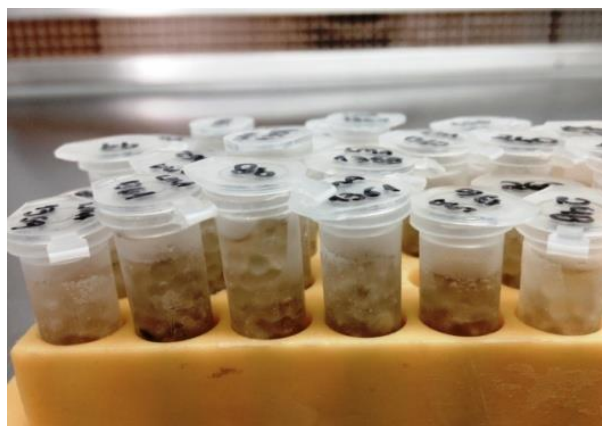
Fonte: software BioEstat (AYRES et al., 2007). Foi avaliada a significância dos valores encontrados entre os tratamentos E (1), ET (2), ECP (3), N (4), NT (5), NCP (6), durante o experimento. $P < 0,05$ indica diferenças significantes.

Esses resultados têm grande importância, em virtude da escassez de metodologia para análise de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por fungos durante longo período de exposição. Existe grande dificuldade em trabalhar com a volatilidade dos BTEX e peculiares exigências de um fungo filamentoso. Esses resultados demonstraram a eficácia do método para recuperação do hidrocarboneto e do frasco na retenção do mesmo, sendo um experimento com alta repetibilidade e significância para próximos estudos. Uma grande contribuição deste trabalho foi que as dificuldades aqui enfrentadas muito contribuíram para o desenvolvimento do espírito investigativo da aluna e a formação de recursos humanos.

6.6 Preservação

Os 50 fungos foram eficazmente preservados pelos dois métodos de preservação propostos, o ultracongelamento a -80°C (figura 5) e por Castelanni (figura 6).

Figura 5- Culturas estudadas preservadas por ultra-congelamento a -80°C .



Fonte: Autor (2014)

Figura 6- Culturas estudadas preservadas por método de Castellani.



Fonte: Autor (2014)

6.7 Identificação

A identificação molecular foi feita com sucesso para 47 dos 50 isolados mediante o sequenciamento da região ITS. Visto que foi possível determinar a nível de espécie 45 fungos e a nível de gênero 2. Com outros 2 isolados foi possível obter apenas identificação a nível de ordem e um 1 isolado não foi possível identificar, devido a dificuldades encontradas para a amplificação e sequenciamento do DNA ribossomal. A lista com as identificações encontra-se registrada no Quadro 3.

No Quadro 3 verifica-se que 38% dos isolados foram identificados como *Exophiala dermatitidis*, um dermatiaceo isolado anteriormente de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (ZHAO, et al., 2010). A alta presença deste fungo pode estar associada ao fato de espécies negras possuírem proteção e maior resistência devido ao pigmento melanina em sua parede celular, também são extremófilos e oligotróficos.

Todos os fungos estudados fomentam o acervo e o banco de dados da coleção de micro-organismos de interesse para petróleo, gás e biocombustíveis, da UNESP de Rio Claro. Nos apêndices B, C, D, E, e F é possível observar exemplos de fichas catalográficas com imagens e as características morfológicas e moleculares principais.

Quadro 3 – Identificação dos isolados fúngicos preservados no Laboratório de Meio Ambiente (LMA)

Código LMA	Identificação	Código LMA	Identificação
34	<i>Pycnidophora dispersa</i>	715	<i>Exophiala dermatitidis</i>
41	<i>Westerdykella dispersa</i>	729	<i>Exophiala dermatitidis</i>
46	<i>Westerdykella dispersa</i>	741	<i>Exophiala dermatitidis</i>
84	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	748	<i>Exophiala dermatitidis</i>
102	<i>Cladosporium sp.</i>	752	<i>Exophiala dermatitidis</i>
144	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	756	<i>Exophiala dermatitidis</i>
171	<i>Phoma cf. macrostoma</i>	759	<i>Exophiala dermatitidis</i>
192	<i>Pseudallescheria boydii</i>	760	<i>Exophiala dermatitidis</i>
227	<i>Paraconiothyrium maculiculis</i>	763	<i>Exophiala dermatitidis</i>
268	<i>Trichoderma cf. koningii</i>	764	<i>Exophiala dermatitidis</i>
602	<i>Cladophialophora devriesii</i>	767	<i>Exophiala dermatitidis</i>
611	<i>Fonsecaea brasiliensis</i>	793	<i>Exophiala dermatitidis</i>
620	<i>Exophiala dermatitidis</i>	796	<i>Exophiala dermatitidis</i>
624	<i>Exophiala dermatitidis</i>	407	<i>Exophiala alcalophila</i>
625	<i>Exophiala dermatitidis</i>	534	<i>Exophiala xenobiotica</i>
D031	<i>Exophiala dermatitidis</i>	538	<i>Cladosporium halotolerans</i>
644	<i>Exophiala dermatitidis</i>	554	<i>Cladophialophora imunda</i>
656	<i>Exophiala dermatitidis</i>	578	<i>Exophiala xenobiotica</i>
707	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	541	<i>Penicillium purpurogenum</i>
708	Chaetothyriales-like	411	<i>Exophiala cf. attenuata</i>
712	<i>Exophiala dermatitidis</i>	413	<i>Peyronellaea glomerata</i>
715	<i>Exophiala dermatitidis</i>	917	<i>Fusarium solani</i>
750	Chaetothyriales-like	920	<i>Paecilomyces formosus</i>
922	<i>Paecilomyces sp</i>	924	<i>Scedosporium dehoogii</i>
927	Sem identificação	931	<i>Aspergillus versicolor</i>

Fonte: Autor (2014)

7 CONCLUSÕES

As metodologias utilizadas para identificação molecular e preservação dos micro-organismos deste estudo, foram adequadas. Pode-se concluir que as técnicas de triagem utilizadas foram bem sucedidas para seleção de micro-organismo tolerante à toxicidade do tolueno e com potencial para degradação do mesmo. Este estudo foi importantes também para caracterizar fungos a respeito de seu potencial para área de biorremediação de hidrocarbonetos monoaromáticos do petróleo e derivados. O experimento provou a eficiência da metodologia utilizada, com a obtenção de resultados positivos da validação do método e também demonstrou a eficiência dos frascos LA-PHA-PACK em evitar a volatilização do tolueno durante os 21 dias de experimento, sendo confiável a utilização deste para monitoramento do decaimento do tolueno associando-o a degradação. Resultado importante, pois são escassas metodologias e frascos eficazes para finalidade deste trabalho. No entanto, os resultados de degradação não foram conclusivos, pois não demonstraram o decaimento significativo da concentração do hidrocarboneto. Este fato pode estar relacionado a concentração utilizada (1%), sendo que na literatura autores utilizam concentrações significativamente menores. Mesmo não tendo apresentado degradação neste teste, existe um grande potencial no fungo selecionado por este estudo, demonstrado pelas triagens feitas. Assim, espera-se um bom resultado quando repetida a metodologia de cromatografia utilizando concentrações mais baixas de tolueno. Outras linhagens aqui estudadas também apresentaram potencial para degradação do hidrocarboneto e serão incluídas em estudos futuros. O trabalho contribui com informações importantes para a estruturação de uma coleção de fungos de importância para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis e para a formação de recursos humanos com capacidade investigativa apurada.

REFERÊNCIAS

- AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, [S.l.], 10:171-179, 2006.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 2nd edition. United States of America: Academic Press, 1999.
- ALMEIDA, J.M.G.C.F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology** Oxford, n. 53, p. 295-303, 2005.
- ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods**. 2nd edition. Oxon: CAB International, 1996.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- ARAÚJO, F.S.M.; LEMOS, J.L.S. **Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo**. In: X Jornada de Iniciação Científica. Centro de Tecnologia Mineral- CETEM/MCT. 2002.
- ARAÚJO, K.C.N. **Degradação de hidrocarbonetos por fungos filamentosos**. 2010. 62f. Monografia (Especialista em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR - 6457: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização. Rio de Janeiro, 1986.
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Summary data for 2013 priority list of hazardous substances, 2013**. Disponível em:
<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2013_SPL_Detailed_Data_Table.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2014.
- ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX)**. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. 154p, 2004.

ATTILI-ANGELIS, D., et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, [S.l.], v.65, p.65 - 75, 2014.

AYRES, M. et al. BioEstat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém, PA: Ong Mamiraua, 2007.

BADALI, H. et al. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potencial use in bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. **Fungal Biology**, [S.l.], v. 115, p. 1019-1029, 2011.

BACKETT, G.D; HUNTLEY, D. Persistence of LNAPL sources: relationship between risk reduction and LNAPL recovery. **Journal of Contaminant Hydrology**. San Diego, v. 59, p.3-26, 2002.

BARBOSA, B.C.A. et al. **Remoção *niger* AN400 de compostos BTX em água residuária sintética por *Aspergillus***. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará. 2009.

BARKER, J.; CHATZIS, J; OLIVEIRA, E. **Petrochemical contamination in the subsurface: processes, site assessment, remediation**. Curso CENPES/PETROBRAS Rio de Janeiro, 1995.

BARON, N.C. **Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis**. 2011. 90f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

BARON, N.C. **Potencial de biodegradação de tolueno por fungos melanizados**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

BENNETT, J.W., WUNCH, K.G., FAISON, B.D. **Use of fungi in bioremediation**. In Manual of Environmental Microbiology. 2nd Edition, Washington, DC: ASM Press, 2001. 960–971.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2003.

BENTO, F.M. et al. Comparative biorremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Oxon, v.96, p. 1049-1055, 2005.

BERNOTH, L. et al. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Minerals and Metallurgical Processing**, [S.l.], 17:105-111, 2000.

CASTELLANI, A. J. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Tropical Medicine and Hygiene**, [S.l.], v. 42, p. 225-226, 1939.

CHAÎNEAU C.H. et al. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v.227, p. 237-247, 1999.

CONSELHO INTERMINISTERIAL DO AÇÚCAR E DO ÁLCOOL (CIMA). **Resolução nº 1, de 28.02.2013 - dou 1.3.2013**, 2013. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cima/2013/r_cima%201%20-%202013.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=9930](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cima/2013/r_cima%201%20-%202013.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=9930)>. Acesso em 18/11/2014.

CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater**. 20th Edition. [SI]: APHA; AWWA and WEF. Washington, 1998.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Norma Técnica L6.245: Solos – Coleta e preparação de amostras – Procedimentos. São Paulo, 1984. 25p.

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J. Natural Bioremediation Perspective for BTEX Contaminated Groundwater in Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p. 43-50, 1996.

CORSEUIL, H. X. et al. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, v. 32, number 7, p. 2065-2073, 1998.

CROUS, P.W. et al. **Fungal biodiversity**. [S.l.]: Amer Phytopathological Society, 2010 (CBS Laboratory Manual Series, v.1).

DAVIES, J.S.; WESTLAKE D.W.S. Crude oil utilization by fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 25, p. 146–156, 1979.

DUARTE, A.P.M. et al. In Vitro Susceptibility of Environmental Isolates of *Exophiala dermatitidis* to Five Antifungal Drugs. **Mycopathologia** (Dordrecht. Online), [S.l], v. 174, p. 1-9, 2012.

ENDO A. et al. Specific inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by koniginic acid (heptelidic acid). **Journal of Antibiotics**, Tokyo, 38. 920-92s. 1985.

ENDO A.; KANBE T. Isolation, chemical structure and mechanism of action of koniginic acid, a new inhibitor of cholesterol synthesis. In: Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids. **Proceedings...** [S.l], 1981. 172-174.

EVANS, P.J. et al. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1139-1145, 1991.

FERNANDES, M. et al. Atmosferic BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. **Chemosphere**, v. 47, p. 417-425, 2002.

FOSTER, L.M.K.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.L. Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Revista Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p 167-172, 1994.

GADD, G.M. **Fungi in Bioremediation**. New York: Cambridge University Press, 2001.

GERARDO, N.M. et al. Exploiting a mutualism: parasite especialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 271, p. 1791-1798, 2004.

GUIGUER, N. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento. **Waterloo Hydrogeologic Inc**. Ontario, 356p. 1996.

GAVA, C.A.T; MENEZES, M.E.L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* sp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 4, 2012.

GUSMÃO, A.D. **Águas Subterrâneas Aspectos de Contaminação e Remediação**. Pernambuco: EDUPE, 2002.

GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. **Annual Review of Microbiology**, [S.l], v. 31, p. 379 – 396, 1977.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, U.K., v.41, p.95-98, 1999.

HALLIWELL, G. Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. **Biochemical Journal**, [S.l], v. 95, p. 270-281, 1965.

HAMMER, K.D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. **Mutation Research**, [S.l], v. 519, p. 171–177, 2002.

HANSON, K.G. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, [S.l], v. 7, p. 745-748, 1993.

HOBARA, T.et al. Estimation of the lethal toluene concentration from the accidental deaths of painting workers. **Industrial Health**, [S.l], v. 38, p. 228 – 231, 2000.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Tópicos em Validação de Métodos. 2003. Disponível em: >http://www.inmetro.gov.br/noticias/eventos/MetQuim_palestras/Valida%E7%E3o%20de%20Metodos%20Anal%EDticos_Oscar%20Bahia.pdf<. Acesso em: 01 dez. 2014.

JACQUES, J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um solo argiloso**. 2005.170f.Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARÍN, J.A. et al. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. **Biodegradation**, [S.l], 17, p. 251-261, 2006.

MELQUIADES, R.A. et al. Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por headspace e cromatografia gasosa/ detector de ionização de chama. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 27, n. 2, p. 113-120, 2006.

MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A serious ground-water contaminant. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n.5, p 394-398, 2011.

MOLLER, E.M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p 6115-6116, 1992.

MME-DNC-MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, DEPARTAMENTO NACIONAL DE COMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico de 1995**, 1995.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, B100:79-94, 2003.

NEIVA, J. **Conheça o petróleo**. Rio de Janeiro, Editora do Livro Técnico. 1986.

NIKOLOVA, N.; NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science and Technology**, [S.l.], v. 51, p. 87–93, 2005.

NUNES, C.C.; CORSEUIL, H.X. Importância do Etanol na Atenuação Natural de Águas Subterrâneas Impactadas por Gasolina. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro. v. 12, p. 259-265. 2007.

OLIVEIRA, S.D. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por Petróleo. **Serie Tecnológica Ambiental**, Rio de Janeiro, v.45, 67p, 2008.

OUDEMANS C.A.J.A, KONING C.J. Prodrôme d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près de Bussum. **Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles**, Sér. 2, 7: 266–298, 1902.

OYARBIDE F; OSTERRIETH M.L; CABELLO M. *Trichoderma koningii* as a biomineralizing fungous agent of calcium oxalate crystals in typical Argudolls of the Los Padres Lake natural reserve (Buenos Aires, Argentina). **Microbiological Research**, 156: 113–119. 2001.

PALA, D.M. et al. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, p. 254 – 260, 2006.

PEDROZA, S. et al. Remoção Anaeróbia dos Componentes BTEX de Água Contaminada por Gasolina. **Revista Brasileira de Recursos Hídrico**, v.14, p.61-67, 2009.

PEDROZO, J.M.F.M. et al. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do petróleo. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, **Secretaria do Planejamento, Ciência e tecnologia**. Salvador. P. 229, 2002.

PETERS, K.E; MOLDOWAN, J.M. **The Biomarker Guide: interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments**. New Jersey: Prentice Hall, 1993.

PHILLIPI JR., A.; MARTINS G. **Águas de abastecimento. Saneamento, Saúde e Ambiente**. Barueri: Editora Manole, 2005.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X., et al. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: Effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Biodegradation**, v.15, p. 59-65, 2004

PRENAFETA-BOLDU, F.X., et al. Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological Research**, v. 105, n. 4, p 477- 484, 2001.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X., et al. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, S; DUARTE, A.C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A; DUARTE, A; SANTOS, T. **O Ambiente e a Saúde. Lisboa**. Instituto Piaget. p.136-176. 2003.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S. (Org.) **Microbiologia Ambiental**. Jaguariuna: Embrapa, p.307-326, 1997.

SANKARANARAYANAN C. et al. Nematicidal effect of fungal filtrates against root-knot nematodes. **Journal of Biological Control**, v. 11, p. 37–41, 1997.

SAMPAIO et al. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Reading**, n. 51, p. 687-697, 2001.

SARKAR, D. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187- 195, 2005.

SATOW, M.M. et al. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, v. 61, p.157–163, 2008.

SILVA-CRUZ, A. **Avaliação dos fatores abióticos e bióticos de uma área petroquímica da região de Paulínia, SP, e fotodocumentação dos fungos transientes isolados**. 2010. 134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010

SILVA, L.C.A. et al. Optimization of Chitosanase Production by *Trichoderma koningii* sp. under Solid-State Fermentation. **Food Bioprocess Technology**, p. 1564–1572, 2012.

SILVA, E.F; MAINIER, F.B. Contaminações ambientais provocadas pelo benzeno existente na gasolina automotiva. In: Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, 2004. Resende, RJ. **Anais...** Resende, RJ: Associação Educacional Dom Bosco, 2004.

SILVA, M.D.A; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito, E. & Azevedo J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, Educs, 2004. P. 337-378

SILVA, R.L.B. et al. Estudos da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para saúde pública no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, [S.l.], v.6, n.18, 2002.

SINGH, H. **Mycorremediation: fungal bioremediation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2006.

SONG X-Y. et al. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, p. 119–125, 2006.

SPINELLI, A.C.C.O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por Hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. 174f. Teste de doutorado em (Geociências) – Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

SOUZA, J. C. et al. Desenvolvimento de método de extração com álcool isopropílico para determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em amostras de solo utilizando GC-FID. In: Reunião anual da sociedade brasileira de química, 28, 2005. Poços de Caldas – MG. **Resumos...** [S.l.], 2005.

TAMURA A.; KOTANI H.; NARUTO S. Trichoviridin and derrnadin from *Trichoderma* sp. TK-I. **Journal of Antibiotics**, p. 161-162, 1975.

TIBURTIUS, E.R.L.; ZAMORA, P.P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e Processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, [S.l.], v.27, p. 441-446, 2004.

TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C.; DURAN, N. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, [S.l.], 31:197–212, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.

WEBER, F.J.; HAGE, K.C.; DE BONT, J.A.M. Growth of the Fungus *Cladosporium phaeospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. **Applied Environmental Microbiology**, [S.l.], v.61, p.3562-3566, 1995.

WOOD, T. M. Cellulolytic Enzyme System of *Trichoderma koningii*: separation of components attacking native cotton. **Biochemical Journal**, Great Britain, 109, 217, 1968.

WORASATIT, N. et al. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of Rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. **Mycological Research**, [S.l.], v. 98, p. 1357–1363. 1994.

WU, D. et al. Biodegradation of petroleum hydrocarbon and BTEX by dominant strains. **Journal of Liaoning Technical University**, [S.l.], 2010.

ZHAO, J. et al. Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons. **Microbial Ecology**, [S.l.], v. 60, p. 149–156, 2010.

ZÍLIO, E. L; PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. **Boletim Técnico PETROBRAS**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 21-25, 2002.

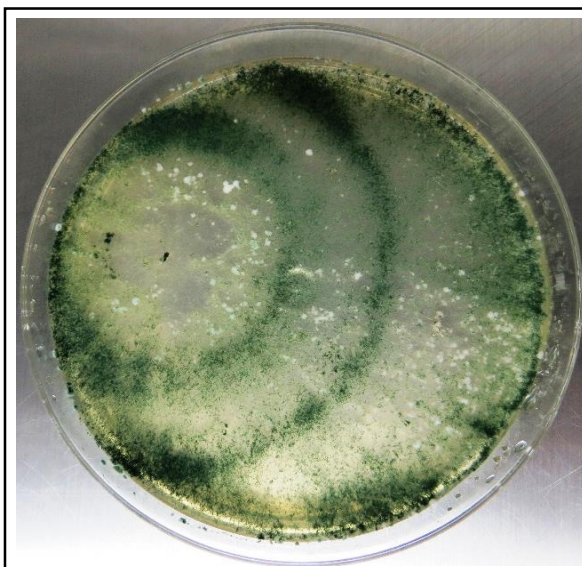
APÊNDICE A - Tabela com os valores de biomassa

CÓDIGO	C+	C-	TOLUENO	CÓDIGO	C+	C-	TOLUENO
34	1,152	0,003	0,017	750	1,105	0,015	0,016
41	1,19	0,004	0,016	752	1,183	0,004	0,013
46	1,252	0,002	0,016	756	1,041	0,004	0,016
84	0,712	0,003	0,017	759	1,103	0,004	0,016
102	0,653	0,003	0,016	760	0,816	0,004	0,016
144	0,725	0,004	0,016	763	0,829	0,034	0,016
171	0,947	0,003	0,016	764	1,087	0,004	0,016
192	1,029	0,003	0,016	767	1,261	0,004	0,017
227	1,981	0,003	0,009	793	0,107	0,004	0,016
268	1,262	0,004	0,016	796	1,043	0,003	0,017
602	1,047	0,004	0,017	407	0,975	0,004	0,013
611	1,102	0,004	0,017	917	1,188	0,003	0,017
620	1,101	0,005	0,017	920	0,531	0,056	0,016
624	1,155	0,003	0,017	922	0,481	0,003	0,017
625	1,144	0,004	0,016	924	1,168	0,004	0,011
D031	1,103	0,002	0,016	927	1,261	0,003	0,015
644	1,163	0,002	0,016	931	1,199	0,003	0,018
656	0,982	0,003	0,017	578	0,372	0,003	0,016
707	0,997	0,004	0,017	534	1,015	0,004	0,016
708	1,043	0,004	0,017	538	1,104	0,004	0,016
712	1,068	0,004	0,017	541	1,127	0,004	0,016
715	1,135	0,004	0,016	588	1,081	0,004	0,016
729	1,266	0,004	0,017	554	1,024	0,004	0,015
741	1,121	0,004	0,017	411	1,192	0,004	0,017
748	1,15	0,004	0,017	413	1,296	0,003	0,016

APÊNDICE B - FICHA CATALOGRÁFICA

Código / Origem:	LMA 268 / Efluente da Refinaria de Petróleo de Paulínia
Identificação:	<i>Trichoderma complexo koningii</i>

Macroscopia da colônia:

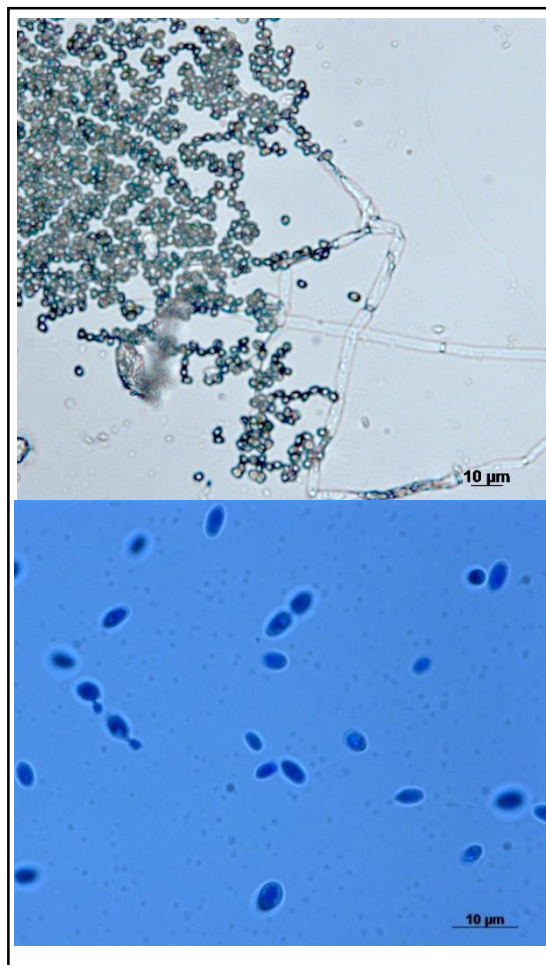


Colônia de *T. cf koningii* com 7 dias de crescimento em MA 2%

Caracterização morfológica:

- Fungo filamentoso, de aspecto pulverulento e coloração verde escuro.
- Conídios com 3-8 um de comprimento e 3,5-4,0 um de diâmetro.

Microscopia:



Hifas e conídios de *Trichoderma cf koningii*

Referência Bibliográfica

OUDEMANS C.A.J.A, KONING C.J. Prodrôme d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près de Bussum. **Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles**, Sér. 2, 7: 266–298, 1902.

Caracterização molecular

A sequência parcial do gene ITS da amostra LMA 268 apresentou alta confiabilidade de identificação com sequências de fungos do complexo *Koningii*, depositadas no banco de dados TrichOkey.

Anexo I. Sequência parcial do gene ITS da amostra analisada.

```
AAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCT  
GTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCG  
CCCGCCGGAGGAACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCT  
TTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT  
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC  
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCT  
GGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGAT  
CGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTG  
GCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCGGGA  
GCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCTGAAATGTTGACCTCG  
GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
```

APÊNDICE C - FICHA CATALOGRÁFICA

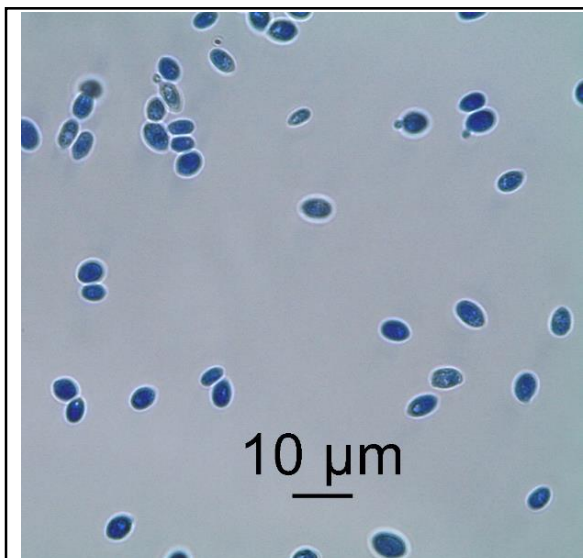
Código / Origem:	LMA 767 / Solo de oficina mecânica
Identificação:	<i>Exophiala dermatitidis</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *E. dermatitidis* com 3 dias de crescimento em ágar Sabouraud.

Microscopia:



Células de *Exophiala dermatitidis*.

Caracterização morfológica

- Colônia leveduriforme, melanizada de coloração olivácea.
- Células ovaladas ou arredondadas com 3,5 - 5,0 µm de comprimento x 2,5 - 3,0 µm de diâmetro.

Referência Bibliográfica

HOOG, G.S. de; GUARRO, J. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, p. 720, 1995.

Caracterização molecular

A sequência parcial do gene ITS da amostra LMA 767 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Exophiala dermatitidis*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS.

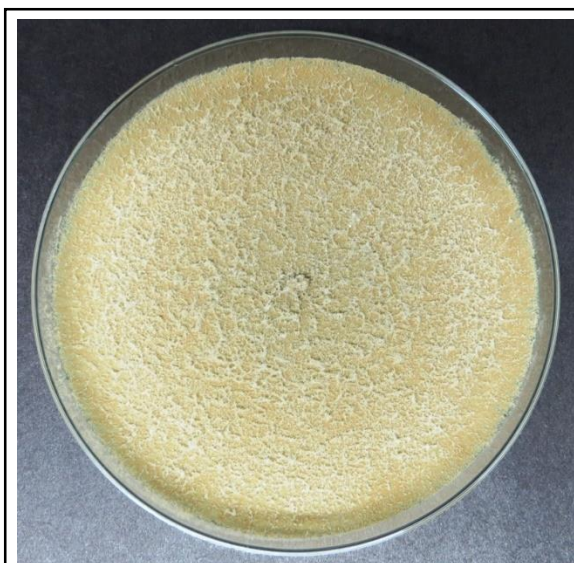
Anexo I. Sequência parcial do gene ITS da amostra analisada.

```
AGGGATCATTAACGAGTTAGGGTCTTCTCAGGCCCCGACCTCCCAACCCTTTGTT
TACCCGACCCGTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCGGAGG
ACCGCCTATTCAAGTCCTCCGGCCCCGCGCCCGCCGGTAGCCAATTCTACCAA
CTCTTGAATCAAATCGTGTCCAATGTCTGAGTATATTACAAAATAAAAGCAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATT
GCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCCTC
AAGCCCCCCCCGGCTTGTTGTTGGACGGTCTGGTCGAGCGTTTCCGCGCGACCC
CTCCCAAAGACAATGACGGCGGCCTGGTTGGACCCCCGGTACACGGAGCTTCT
TCACTGAGCACGTATCGGTTTCAAGGTGTCCCCGGGACCCGGTCGACCTCTCTT
GCTCCCCTGCGGGAGTGGGAGAGACCCCCCTTTTTATCAAGGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA-
```

APÊNDICE D - FICHA CATALOGRÁFICA

Código / Origem:	LMA 920 / Madeira com creosoto
Identificação:	<i>Paecilomyces formosus</i>

Macroscopia da colônia:

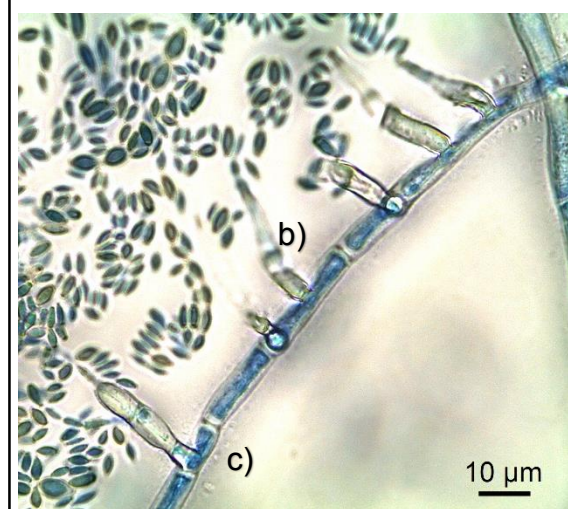
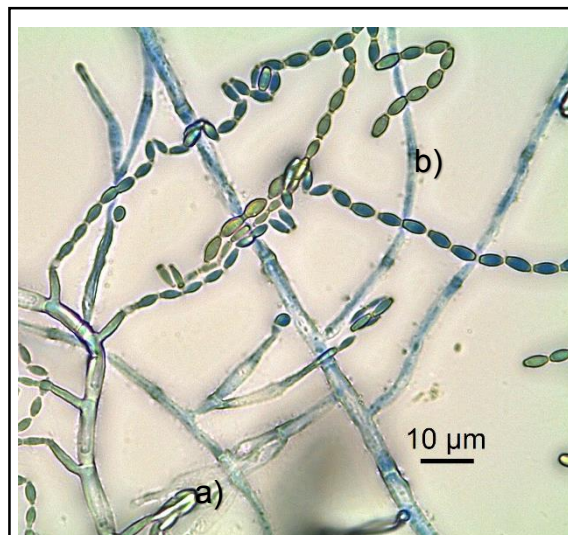


Colônia de *Paecilomyces formosus* com 7 dias de crescimento em MA 2%

Caracterização morfológica:

- Fungo filamentosso, colônia de aspecto furfuráceo e cor oliva.
- Conídios ovalados com 3,9-4,6 µm de comprimento por 2,9-3,1 µm de diâmetro
- Fiálides com 18,0–23,0 µm de comprimento por 3,4-3,5 µm de diâmetro.

Microscopia:



a) conidióforo verticilado; b) conídios; c) conidióforo simples

Referência Bibliográfica:

SAMSON, R.A., et al. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia**, [S.l.], v. 22, p. 14-27, 2009.

Caracterização molecular

A sequência parcial do gene ITS da amostra LMA 920 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Paecilomyces formosus*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS.

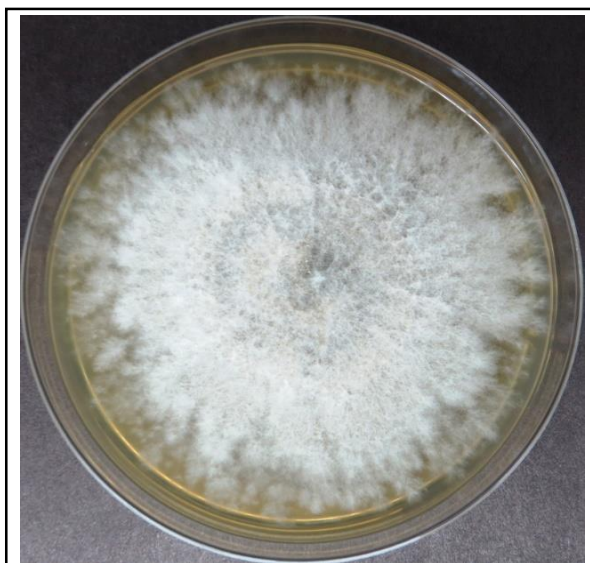
Anexo I. Sequência parcial do gene ITS da amostra analisada.

```
AAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGAGGCCCAACCTCCCATCCGTGTTG
TTAAACACCTGTTGCTTCGGCGGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCGTGGCCGCCGG
GGGGCATCTCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAACGCTGCC
TTGAAGGTTGCCGTCTGAGTATGAAATTCAATCGTTAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCA
TTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCTCCAGCCCGGCTGG
TGTGTTGGGTCGACGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGG
CGCCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACGCGCTCTGGTAGGGT
CGGCCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCACCTATTATTTTCTCTTAGGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
```

APÊNDICE E - FICHA CATALOGRÁFICA

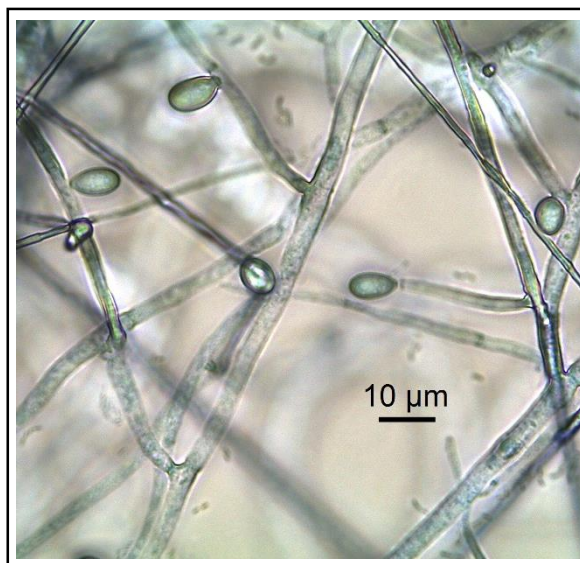
Código / Origem:	LMA 924 / Efluente da Refinaria de Petróleo de Paulínia
Identificação:	<i>Scedosporium dehoogii</i> do complexo <i>Pseudallescheria boydii</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *Scedosporium dehoogii* com 7 dias de crescimento em MA 2%

Microscopia:



a) conídios sésseis e células conidiogênicas

Caracterização morfológica:

- Fungo filamentoso, colônia com aspecto algodinoso e coloração branco-acinzentada.
- Conídios de formato ovalado com 9,2-11,0 µm de comprimento por 4,5-5,0 µm de diâmetro.

Referência Bibliográfica

GILGADO, F. et al. Molecular and Phenotypic Data Supporting Distinct Species Statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the Proposed New Species *Scedosporium dehoogii*. **Journal of Clinical Microbiology**. [S.l.], v. 46, p. 766-771, 2008.

Caracterização molecular

A sequência parcial do gene ITS da amostra LMA 924 apresentou 99% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Scedosporium dehoogii*, depositadas no banco de dados GenBank e CBS.

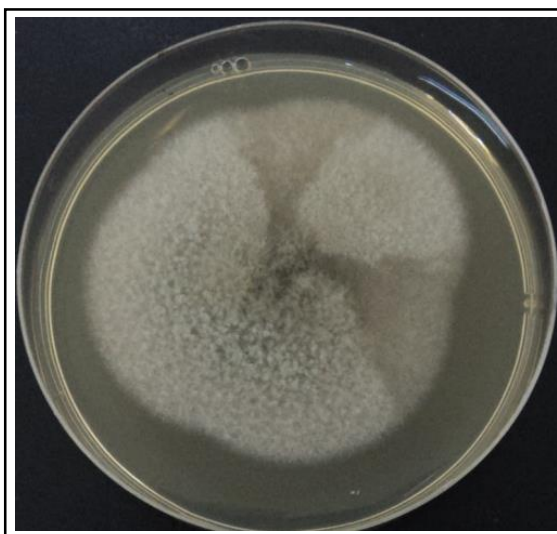
Anexo I. Sequência parcial do gene ITS da amostra analisada.

```
AGGGATCATTACAGAGTTACTACTCCAAACCCATTGTGAACCTTACCTATGTTCT
GTTGCCTCGGCGGGCGCGGTCAGCGCCCGAAAGGACGACGGCCCCCGCCGGC
AGCACCAAACCTCTTGAATTTTACAGCGGATTACAGTTCTGATTTGAAACAAAAA
ACAAGTTAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACATTGCGCCCCGGCAGTAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA
TTTCAACCCTCGAACCTCTGTTTCCTCAGGGAAGCTCAGGGTCGGTGTGTTGGGGC
GCTACGGCGAGGTCTTCGCGACCCCCGTAGGCCCTGAAATACAGTGGCGGTCC
CGCCGCGGTTGCCTTCTGCGTAGTAAGTCTCTTTTGCAAGCTCGCATTGGGTCC
CGGCGGAGGCCTGCCGTCAAACCACTATAACTCCAGATGGTTTGACCTCGGAT
CAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAA
```


APÊNDICE F - FICHA CATALOGRÁFICA

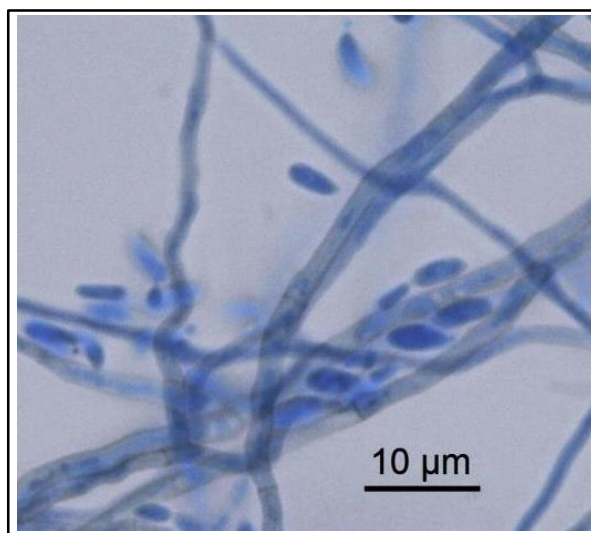
Código / Origem:	LMA 84 / Efluente da Refinaria de Petróleo de Paulínia/SP
Identificação:	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>

Macroscopia da colônia:



Colônia de *M. arundinis* com 7 dias de crescimento em MA 2%.

Microscopia:



Micélio e conídios de *Microsphaeropsis arundinis*.

Caracterização morfológica

- Fungo filamentoso, aspecto algodonoide de coloração branca.
- Diâmetro da colônia: 6,5 cm x 6,2 cm
- Conídios com 5 - 6µm comprimento x 1,5 - 2µm largura

Referência Bibliográfica:

AVESKAMP, M.M.; de GRUYTER, J.; WOUTENBERG, J.H.C.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W. Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, n.65, p 1-60, 2010.

Caracterização molecular

A sequência parcial do gene ITS da amostra LMA 84 apresentou 100 % de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Microsphaeropsis arundinis*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS.

Anexo I. Sequência parcial do gene ITS da amostra analisada.

```
TAACACTCTTACGCGCCACATGTCTGAATCCTTTTTTTACGAGCACCTTTCGTTC
TCCTTCGGTGGGGCAACCTGCCGTTGGAACCTTATCAAACCTTTTTTTGCATCTA
GCATTACCTGTTTCAGATACAAACAATCGTTACAACCTTTCAACAATGGATCTCTTG
GCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATG
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGG
CGTCTGTCCCGCCTCTGCGCGTGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCT
TTGCCTCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCAGAGGGGTGTGGGCGCGTCCA
CGAAGCAACATTATCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT
TAAG
```

ANEXO A – Análise química do solo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal
 DEPARTAMENTO DE SOLOS E ADUBOS
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP 14884-900 - Fone/Fax: (16) 3209-2672/2673
 e-mail: solos@fcav.unesp.br
 LABORATORIO DE ANALISE DE SOLO E PLANTA

Proprietario: PROFA.DRA.DEJANIRA DE F. DE ANGELIS
 Endereco : DEPTO BIOQUIMICA E MICROBIOLOGIA
 Bairro :
 Municipio : RIO CLARO Fone:
 Estado : SP
 Data entrada: 20/05/14
 Data saida : 29/05/14

Propriedade: DEPTO BIOQUIMICA E MICROBIOLOGIA
 Endereco :
 Municipio : RIO CLARO
 Estado : SP
 Fone :



ANALISE QUIMICA DE SOLO - MICRONUTRIENTES, S-SO₄ E Al

Numero amostra	B	Cu	Fe	Mn	Zn	S-SO ₄	Al
Lab. Interes.	mg/dm ³						mmol _c /dm ³
002867 01	0.77	4.1	31	17.0	2.4	21	3
002868 02	0.75	4.1	31	16.6	2.3	20	3
002869 03	0.78	4.0	30	16.7	2.4	21	3

01 - SOLO DE JARDIM
 02 - SOLO DE JARDIM
 03 - SOLO DE JARDIM



ANEXO B - Análise química do solo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ADUBOS
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP 14884-900 - Fone/Fax: (16) 3209-2672/2673
e-mail: solos@fcav.unesp.br
LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE SOLO E PLANTA

Proprietário: PROFA.DRA.DEJANIRA DE F. DE ANGELIS
Endereço : DEPTO BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA
Bairro :
Município : RIO CLARO Fone:
Estado : SP
Data entrada: 20/05/14
Data saída : 29/05/14

Propriedade: DEPTO BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA
Endereço :
Município : RIO CLARO
Estado : SP
Fone :



ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Número amostra		pH	M.D.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
Lab.	Interes.	em CaCl ₂ g/dm ³		resina mg/dm ³				meol/dm ³			%
002867	01	4.9	32	9	1.6	37	16	58	54.6	112.6	48
002868	02	4.8	31	9	1.4	35	15	52	51.4	103.4	50
002869	03	4.8	30	8	1.4	36	16	58	53.4	111.4	48

01 - SOLO DE JARDIM
02 - SOLO DE JARDIM
03 - SOLO DE JARDIM

COMISSÃO DE SUPERVISÃO
DAS ANÁLISES DE ROTINA