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

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS
POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS

GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Dezembro - 2016

GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS POR
CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências Biológicas
(Área: Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

RIO CLARO
2016

620.1122 Vieira, Gabriela Alves Licursi
V658d Destoxificação e descoloração de poluentes ambientais por
consórcios microbianos marinhos / Gabriela Alves Licursi
Vieira. - Rio Claro, 2016
138 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette

1. Biodegradação. 2. Poluentes ambientais. 3. Consórcios
microbianos. 4. Toxicidade aguda. 5. Fungos derivados de
ambiente marinho. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS POR
CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS

AUTORA: GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. VALERIA MAIA DE OLIVEIRA
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola / Universidade Estadual de Campinas

Dra. VERA MARIA VALLE VITALI
Instituto de Botânica

Rio Claro, 19 de dezembro de 2016

Dedico mais esta conquista, primeiramente, a Deus pela dádiva da vida;

Aos meus pais, Tereza e Joel, pelas grandes oportunidades que sempre me proporcionaram, por todo o apoio e pelo amor incondicional;

Aos meus irmãos, Daniela e Ernane, pela ótima convivência e pela alegria de cada reencontro;

A minha cunhada querida;

E à Rebecca, minha sobrinha amada, meu pacotão de alegria, motivo da minha mais recente felicidade, dos meus risos mais leves e do amor mais profundo.

Vocês são a luz no meu caminho e minha força para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Lara Sette pela oportunidade em realizar este trabalho, pela paciência, pela compreensão com os altos e baixos da vida, além da boa e enriquecedora convivência;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2012/12622-3, pela bolsa de Doutorado concedida e pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa;

Aos colegas do laboratório LAMAI Lia, Marina, Lídia, Fábio Ji, Vivi, Davi e também àqueles que já não estão presentes agradeço pelas muitas colaborações, conversas e risos nos momentos de descontração;

Ao Igor e Pedro pelas grandes ajudas nos momentos finais deste trabalho;

À Juliana, minha gratidão pela grande amizade, pelo apoio e pela companhia agradável em todos os momentos, bons ou ruins;

À Otávia, minha companheira de passagem por Rio Claro, com quem compartilhei quatro anos de convivência leve e muito agradável;

À Cárol pelas valiosas ajudas com a disciplina de Microbiologia para o curso de Ciências Biológicas e pela amizade;

À Ju M companheira de piscina, de clube, de Unesp pela amizade e pela fé que sempre me trazia boas reflexões;

Às minhas alunas Cindy e, em especial, à Carla, pelas inúmeras contribuições neste trabalho;

À Thaís, Fabi e Ju Basso pela amizade rio-clarense;

À Márcia, minha querida amiga de longa data, que mesmo distante sempre está muito presente, dentro do meu coração;

À Dra. Milene Ferro pelas análises de metatranscriptoma e por me ajudar na correria de última hora;

Ao Adriano pela ajuda com as análises de FTIR;

Aos colegas do laboratório LESF e ao Prof. André Rodrigues, e aos demais colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia;

Aos meus amigos, presentes ou distantes, pelo simples fato de existirem e trazerem tantas coisas boas à minha vida;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Com certeza, a jornada foi mais leve com a companhia de vocês.

Minha eterna gratidão!

"E guardemos a certeza pelas próprias dificuldades já superadas que não há mal que dure para sempre."

Chico Xavier

...TUDO PASSA...

RESUMO

Considerando a importância dos processos de biorremediação, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial de consórcios microbianos, constituídos por quatro fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos e duas bactérias recuperadas de reservatório de petróleo, na destoxificação de poluentes ambientais, por meio da sobrevivência do microcrustáceo *Artemia* sp. e da luminescência da bactéria *Vibrio fischeri*. Após estudos de antagonismo entre os micro-organismos, foram estruturados oito consórcios microbianos, em diferentes combinações. Os consórcios foram usados, isoladamente, para avaliar a toxicidade dos poluentes ambientais corante têxtil RBBR (*Remazol Brilliant Blue R*), óleo diesel e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Dentre os consórcios estudados, o consórcio 3, composto por dois fungos filamentosos e pelas duas bactérias, apresentou melhores resultados de destoxificação do corante RBBR e óleo diesel, após sete dias de cultivo a 28 °C e 140 rpm. As enzimas ligninolíticas apresentaram atividade baixa ou ausente no teste feito com o corante e com o óleo diesel. Para o benzo[a]pireno (BaP), apesar de ter havido uma produção mais expressiva de enzimas ligninolíticas, os resultados de destoxificação foram incoerentes, por não apresentar toxicidade mesmo em elevadas concentrações. Sendo assim, no presente estudo o consórcio 3 foi empregado na otimização da destoxificação e descoloração do corante RBBR. Os resultados de dois planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB1 e PB2) e um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) revelaram que as melhores condições de destoxificação/descoloração foram obtidas no ensaio 11 do PB1 e no ensaio 2 do PB2. As condições de cultivo desses dois ensaios foram submetidas a experimentos de validação, porém somente a condição do ensaio 2 do PB2 (inóculo de 4 cilindros de 0,5 cm de cada fungo e 4 mL de cada bactéria (DO 0,4), 1 g/50 mL de farelo de trigo, 100 % de água do mar, pH 8 e 500 ppm de RBBR) apresentou resultados coerentes (52 % de destoxificação e 87 % de descoloração). A atividade de enzimas ligninolíticas na validação foi baixa ou ausente. As análises de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) resultaram em diferenças no padrão de bandas do corante, quando comparadas às bandas do bioensaio e do controle, indicando atuação dos micro-organismos no processo de descoloração. Os estudos dos metatranscriptomas do experimento de validação (bioensaio e controle) revelaram diferenças na expressão gênica de

enzimas específicas envolvidas no processo de degradação de compostos xenobióticos, com destaque para dioxigenase e mono-oxigenases. Tais resultados evidenciam o papel do consórcio microbiano, principalmente das bactérias, na destoxificação, descoloração e degradação do corante têxtil RBBR. Os resultados do presente trabalho demonstram a importância da aplicação do planejamento experimental e da metatranscriptômica para o estudo de destoxificação e degradação de poluentes ambientais, abrindo perspectivas para novos estudos envolvendo os micro-organismos do consórcio selecionado.

Palavras-chave: Poluentes ambientais. Consórcios microbianos. Biodegradação. Toxicidade aguda. Fungos derivados de ambiente marinho.

ABSTRACT

Taking into account the relevance of bioremediation processes, the present work aimed to evaluate the potential of microbial consortia composed by four filamentous fungi isolated from marine invertebrates and two bacteria recovered from oil reservoirs in the detoxification of environmental pollutants, through the survival of the microcrustacean *Artemia* sp. and the luminescence of the bacterium *Vibrio fischeri*. After studies of antagonism between the microorganisms, eight microbial consortia were structured in different combinations. The consortia were tested separately against the environmental pollutants RBBR (Remazol Brilliant Blue R) textile dye, diesel oil, and polycyclic aromatic hydrocarbons. Among the consortia studied, the consortium 3, composed of two filamentous fungi and two bacteria presented better results of RBBR dye and diesel detoxification after seven days at 28 °C and 140 rpm. Ligninolytic enzymes showed low or absent activity in the experiments containing RBBR and diesel. For benzo[a]pyrene (BaP), although there was a more expressive production of ligninolytic enzymes, the results of detoxification were incoherent, since no toxicity was showed even at high concentrations. Therefore, in the present study the consortium 3 was used to optimize detoxification and discoloration of RBBR dye. Results from two Plackett-Burman designs (PB1 and PB2) and one CCD (Central Composite Design) revealed that the best conditions for detoxification/ discoloration were obtained in the assay 11 from PB1 and assay 2 from PB2. The culture conditions of this two assays were submitted to validation experiments, however only assay 2 from PB2 (4 cylinders (0.5 cm) of each fungus, and 4 mL of each bacteria (OD 0.4), 1 g/50 mL wheat bran, 100 % artificial sea water, pH 8, and 500 ppm RBBR) presented consistent results (52 % detoxification and 87 % discoloration). The activity of ligninolytic enzymes in the validation experiments was low or absent. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analyzes showed difference in the dye bands pattern in comparison to the bioassay and control bands, indicating the microbial performance in the process of dye discoloration. Metatranscriptome studies in the validation experiments (bioassay and control), revealed a differential gene expression of specific enzymes involved in the degradation of xenobiotic compounds, mainly dioxygenase and monooxygenases. These results highlight the role of the microbial consortium, mainly the bacteria, in the detoxification, discoloration, and

degradation of the RBBR textile dye. Results from the present work demonstrate the importance of applying environmental design and metatranscriptomic approaches to the study of detoxification and degradation of environmental pollutants, opening perspectives for new studies involving the microorganisms of the selected consortium.

Keywords: Environmental pollutants. Microbial consortia. Biodegradation. Acute toxicity. Marine-derived fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias propostas para o catabolismo microbiano de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.	22
Figura 2. Estrutura molecular do pireno (A) e benzo[a]pireno (B).	24
Figura 3. Estrutura molecular do corante têxtil RBBR.	26
Figura 4. Esquema demonstrativo do teste de inibição entre os micro-organismos selecionados para a estruturação dos consórcios. No centro e nas três extremidades foram inoculados os micro-organismos, ficando uma extremidade livre (controle) para crescimento do organismo central.	34
Figura 5. Testes de inibição (antagonismo) entre os micro-organismos propostos para estruturação dos consórcios. Todos os quatro fungos filamentosos e as duas bactérias foram testados entre si em meio malte 2 % (A-H) e as duas bactérias em ágar nutriente (I).	41
Figura 6. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência do corante RBBR.	42
Figura 7. Percentual de descoloração do corante têxtil RBBR pelos consórcios microbianos, comparado aos resultados do teste controle (constituído de RBBR 500 ppm).	43
Figura 8. Percentual de adsorção do corante têxtil RBBR pela biomassa morta dos consórcios microbianos, comparado ao teste com controle (contendo RBBR 500 ppm).	44
Figura 9. Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, LiP e MnP) dos ensaios contendo os consórcios microbianos na presença e ausência do corante têxtil RBBR.	45
Figura 10. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência de diesel.	48
Figura 11. Atividade enzimática (lacase, LiP e MnP) dos consórcios microbianos contendo diesel como poluente e em sua ausência.	49
Figura 12. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência de BaP.	51
Figura 13. Atividade das enzimas ligninolíticas lacase, LiP e MnP dos consórcios contendo BaP e em sua ausência.	52
Figura 14. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no PB1. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.	65
Figura 15. Efeito das 13 variáveis estudadas no PB1 na destoxificação do RBBR.	67
Figura 16. Efeito das 13 variáveis estudadas no PB1 na descoloração do RBBR.	67
Figura 17. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no PB2. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.	69
Figura 18. Efeito das nove variáveis na destoxificação do RBBR obtidos no PB2.	70
Figura 19. Efeito das nove variáveis na descoloração do RBBR obtidos no PB2.	71
Figura 20. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no DCCR. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.	72

Figura 21. Efeito das duas variáveis na destoxificação do RBBR obtidos no DCCR.	73
Figura 22. Efeito das duas variáveis na descoloração do RBBR obtidos no DCCR.	74
Figura 23. Validação experimental do ensaio 2 do PB2 quanto à destoxificação.....	76
Figura 24. Curvas de descoloração do corante RBBR obtidas nos ensaios de validação, realizados em quadruplicata.	77
Figura 25. Adsorção do corante RBBR pela biomassa microbiana e pelo farelo de trigo.	78
Figura 26. Medidas de biomassa seca após validação do ensaio 2 (PB2).....	79
Figura 27. Atividade das enzimas ligninolíticas na condição validada.....	81
Figura 28. Espectro de FTIR comparando RBBR 500 ppm com o bioensaio validado para destoxificação/descoloração do corante e controles.	82
Figura 29. Representação gráfica gerada pelo programa FASTQC da qualidade <i>Phred</i> média por base dos <i>reads</i> , antes do pré-processamento. (A) bioensaio e (B) controle.	88
Figura 30. Representação gráfica gerada pelo programa FASTQC da qualidade <i>Phred</i> média por base dos <i>reads</i> , após etapas do pré-processamento com o auxílio dos programas FASTX Toolkit Trimmer e SeqyClean. (A) bioensaio e (B) controle.	90
Figura 31. Gráfico gerado pelo programa FASTQC, mostrando a qualidade <i>Phred</i> por sequência. (A) bioensaio e (B) controle.	91
Figura 32. Principais classes enzimáticas para o bioensaio.....	100
Figura 33. Principais classes enzimáticas para o controle.	100
Figura 34. Gráfico obtido pelo Blast2GO, baseado em dados do NCBI (<i>GenBank</i>) de organismos que apresentaram similaridade com as sequências (específicas) do metatranscriptoma do consórcio microbiano. (A) bioensaio e (B) controle.	102
Figura 35. Distribuição dos termos Ontologia Gênica (GO): Função molecular, componente celular e processo biológico	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos selecionados para o estabelecimento dos consórcios – descrição de suas propriedades e fonte de isolamento.	32
Tabela 2. Consórcios microbianos estruturados em diferentes combinações e os respectivos micro-organismos constituintes.	34
Tabela 3. Classificação das faixas de toxicidade aguda segundo Bulich (1992).	37
Tabela 4. Diferença entre o percentual de descoloração e adsorção (pela biomassa morta) do corante têxtil RBBR – descoloração real.	44
Tabela 5. Toxicidade aguda (EC_{50} - %) das amostras representativas dos consórcios microbianos contendo corante têxtil RBBR (destaque para o consórcio 3).	46
Tabela 6. Toxicidade aguda (EC_{50} - %) de amostras dos consórcios microbianos contendo diesel (destaque para consórcio 3).	50
Tabela 7. Análise de toxicidade em <i>Artemia</i> sp. (percentual de indivíduos vivos) dos consórcios contendo o poluente BaP e em sua ausência, além de controles.	53
Tabela 8. Análise de toxicidade de diferentes concentrações de BaP em <i>Artemia</i> sp. (percentual de indivíduos vivos).	54
Tabela 9. Análise de toxicidade de diferentes concentrações de pireno em <i>Artemia</i> sp. (percentual de indivíduos vivos).	54
Tabela 10. Níveis das variáveis estudadas no 1º planejamento experimental Plackett-Burman para o corante RBBR.	60
Tabela 11. Níveis das variáveis estudadas no 2º planejamento Plackett-Burman para o corante RBBR.	61
Tabela 12. Níveis das variáveis estudadas no DCCR para o corante RBBR.	62
Tabela 13. Resultados de destoxificação e descoloração dos ensaios do PB1. Destaque para os resultados de destoxificação e descoloração obtidos no ensaio 11.	64
Tabela 14. Resultados de destoxificação e descoloração dos ensaios do PB2. Destaque para os resultados de destoxificação e descoloração obtidos no ensaio 2.	68
Tabela 15. Resultados dos ensaios do DCCR.	73
Tabela 16. Banco de genes de enzimas possivelmente envolvidas na degradação de poluentes ambientais.	85
Tabela 17. Quantidade de <i>reads</i> , antes e após pré-processamento.	92
Tabela 18. <i>Contigs</i> totais e ao final, após filtragem por tamanho de sequência (300 pb).	92
Tabela 19. Nome do <i>contig</i> , descrição do gene advinda da pesquisa no banco de dados NR do NCBI e o número da enzima (EC) - Bioensaio. As enzimas envolvidas em vias metabólicas de degradação de xenobióticos/poluente/drogas estão destacadas em negrito.	97
Tabela 20. Nome do <i>contig</i> , descrição do gene advinda da pesquisa no banco de dados NR do NCBI e o número da enzima (EC) – Controle. As enzimas envolvidas em vias metabólicas de degradação de xenobióticos/poluente/drogas estão destacadas em negrito.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina

ASW – Água do mar artificial

BaP – Benzo[a]pireno

CBMAI – Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria/UNICAMP

CONS – Consórcio microbiano

CRM – Central de Recursos Microbianos UNESP/RC

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DEPC – Dicarbonato de dietila

DO – densidade óptica

EC – *Enzyme Commission Number*

EC₅₀ – Concentração efetiva

EPS – Exopolissacarídeos

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GO – *Gene Ontology*

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LiP – lignina peroxidase

MA2 – ágar malte 2 %

MnP – Manganês peroxidase

MO – micro-organismos

NA – Ágar nutriente

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NGS – Sequenciamento de nova geração

NR – Não redundante

PB – Plackett-Burman

PPM – Partes por milhão

RBBR – *Remazol Brilliant Blue R*

RIN – *Integrity Number*

U/L – Unidade enzimática por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Micro-organismos de origem marinha aplicados à biorremediação de poluentes ambientais	20
2.2. Poluentes ambientais	23
2.2.1. Poluentes ambientais empregados neste trabalho	23
2.2.1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	23
2.2.1.2. Óleo Diesel.....	24
2.2.1.3. Corante têxtil <i>Remazol Brilliant Blue R</i> (RBBR)	25
2.3. Consórcios microbianos	26
2.4. Análises de toxicidade.....	27
2.4.1. <i>Artemia</i> sp.....	27
2.4.2. Microtox	28
2.5. Planejamento experimental.....	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
CAPÍTULO I	31
ESTRUTURAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS E SELEÇÃO DO MELHOR CONSÓRCIO DESTOXIFICADOR DE POLUENTES AMBIENTAIS	31
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Micro-organismos	31
2.2. Teste de inibição entre micro-organismos propostos para comporem os consórcios microbianos	33
2.3. Estruturação dos consórcios microbianos.....	34
2.4. Cultivo dos micro-organismos e estruturação do experimento de destoxificação e descoloração dos poluentes ambientais	35
2.5. Biomassa seca.....	36
2.6. Análise de toxicidade aguda	36
2.6.1. Microtox.....	36
2.6.2. <i>Artemia</i> sp.	37
2.7. Atividade das enzimas ligninolíticas dos consórcios microbianos frente aos diferentes poluentes	38

2.7.1.	Lignina Peroxidase (LiP)	38
2.7.2.	Manganês Peroxidase (MnP)	38
2.7.3.	Lacase	38
2.8.	Descoloração do corante têxtil RBBR	39
2.9.	Adsorção do corante têxtil RBBR pela biomassa.....	39
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1.	Teste de inibição dos micro-organismos.....	40
3.2.	Corante têxtil RBBR (500 ppm).....	41
3.2.1.	Biomassa seca	41
3.2.2.	Descoloração	42
3.2.3.	Adsorção pela biomassa	43
3.2.4.	Atividade enzimática.....	45
3.2.5.	Toxicidade aguda - Microtox	45
3.3.	Óleo diesel	48
3.3.1.	Biomassa seca	48
3.3.2.	Atividade enzimática.....	48
3.3.3.	Toxicidade aguda - Microtox	49
3.4.	Benzo[a]pireno - BaP	50
3.4.1.	Biomassa seca	50
3.4.2.	Atividade enzimática.....	51
3.4.3.	Toxicidade aguda - <i>Artemia</i> sp.....	52
3.5.	Seleção do melhor consórcio destoxificador.....	54
CAPÍTULO II		58
OTIMIZAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTEL RBBR POR CONSÓRCIO MICROBIANO MARINHO, UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....		58
1.	INTRODUÇÃO	58
2.	MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1.	Planejamento experimental.....	59
2.1.1.	1º Planejamento Plackett-Burman (PB1).....	59
2.1.2.	2º Planejamento Plackett-Burman (PB2).....	60
2.1.3.	DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)	61
2.2.	Validação experimental.....	62
2.2.1.	FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)	62

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. 1º Planejamento experimental (PB1)	63
3.2. 2º Planejamento Experimental (PB2).....	68
3.3. DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)	71
3.4. Validação experimental.....	75
3.4.1. Análises de FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)	81
CAPÍTULO III	83
METATRANSCRIPTOMA DA CONDIÇÃO VALIDADA DE DESTOXIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL RBBR.....	83
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAL E MÉTODOS	84
2.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade.....	84
2.2. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	84
2.3. Montagem de banco de dados de genes de enzimas específicas	85
2.4. Pré-processamento dos <i>reads</i>	86
2.5. Montagem dos <i>contigs</i> , busca por genes específicos e anotação	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
3.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade.....	87
3.2. Pré-processamento dos <i>reads</i>	87
3.3. Montagem dos <i>contigs</i> , busca por genes específicos e anotação	92
4. CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO GERAL

Contaminações ambientais, tais como água, solo e águas subterrâneas, ocorrem frequentemente pelo acúmulo de compostos orgânicos aromáticos que abrangem hidrocarbonetos monocíclicos, policíclicos ou heterocíclicos (OBEROI; PHILIP, 2017). Um grande número de compostos orgânicos que são caracterizados como poluentes ambientais são dispersos no ambiente por meio das diversas ações antrópicas. Esses poluentes incluem, entre outros, corantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), pesticidas, solventes químicos, os quais muitas vezes são recalcitrantes e colocam em risco a saúde humana e o equilíbrio do próprio ambiente (SU; ZHU; SHEN, 2016).

As atividades industriais, tais como as desenvolvidas pelas indústrias têxteis, de papel e celulose, de petróleo e farmacêutica, geralmente consomem grandes volumes de água e produtos químicos orgânicos que podem conter características inadequadas para o equilíbrio do ambiente (e.g. pH e toxicidade). Dessa forma elas podem gerar uma grande quantidade de efluentes, com as mais diversas substâncias tóxicas, que necessitam ser tratados, antes de serem dispensados no ambiente. No entanto, as estruturas complexas que esses poluentes apresentam, tais como, duplas ligações e anéis aromáticos, dificultam a sua degradação e/ou remoção do ambiente (AKSU, 2005).

De acordo com Oberoi e Philip (2017), para o tratamento de efluentes industriais é necessária a escolha de técnicas de remediação que minimizem o impacto desses resíduos no ambiente. Neste contexto, a biorremediação surge como uma vertente bastante forte da ciência ambiental e da biotecnologia, por ser uma estratégia relacionada com a aplicação de micro-organismos e processos biológicos para diminuição do impacto de poluentes no ambiente (KUMAR et al., 2011). Liu et al. (2016) afirmam que a biorremediação é uma tecnologia mais efetiva, além de ser de baixo custo, quando comparada à remediação físico-química.

Segundo Ganey e Boyd (2005), o principal objetivo da biorremediação é a conversão de compostos orgânicos tóxicos em moléculas mais simples, de composição menos tóxica, embora possa ocorrer a formação de intermediários estáveis. Porém, nesse processo, muitas vezes não são considerados os produtos finais ou intermediários tóxicos, o que é uma realidade, já que é possível a formação de compostos intermediários mais tóxicos que o próprio composto original. Assim, os

autores ressaltam a importância de avaliar a toxicidade de produtos finais e intermediários de um processo de biorremediação.

Os ambientes marinhos são caracterizados pelas condições físicas e químicas diversas (pH, salinidade, variações de temperatura, entre outras). Desta forma, os micro-organismos presentes nesses ambientes estão mais adaptados às condições adversas e, por isso, podem possuir características vantajosas à degradação de poluentes, quando comparados aos seus análogos terrestres (DASH et al., 2013). Devido ao fato de resistirem e de se desenvolverem em condições variáveis, os micro-organismos de origem marinha possuem grande potencial para aplicação em processos de biorremediação, principalmente aqueles conduzidos em condições salinas (BIROLI et al., 2016).

Diante do acima exposto, no presente trabalho foi avaliada a destoxificação dos poluentes ambientais HPAs (benzo[a]pireno e pireno), diesel e corante têxtil *Remazol Brilliant Blue R* (RBBR) por consórcios microbianos compostos por fungos derivados de ambiente marinho e bactérias isoladas de reservatório de petróleo (*off-shore*). Um total de seis micro-organismos (quatro fungos filamentosos e duas bactérias), os quais não apresentaram antagonismo quando cultivados conjuntamente em meio sólido, foram combinados em oito consórcios microbianos. Esses micro-organismos foram previamente selecionados, devido à capacidade de degradar poluentes ambientais, produzir enzimas ligninolíticas e/ou biossurfactantes.

As avaliações de toxicidade foram inicialmente realizadas empregando-se o equipamento Microtox e a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. No entanto, para os HPAs, esse método não foi adequado e os resultados obtidos foram incongruentes. Alternativamente, foi utilizado o microcrustáceo *Artemia* sp. como bioindicador de toxicidade das amostras obtidas, e esta análise mostrou-se eficaz, de rápida execução e de baixo custo, sendo possível empregá-la para todos os poluentes estudados.

O presente trabalho foi dividido em três capítulos:

- **CAPÍTULO I** - Estruturação de consórcios microbianos marinhos e seleção do melhor consórcio destoxificador de poluentes ambientais
- **CAPÍTULO II** - Otimização da destoxificação e descoloração do corante têxtil RBBR por consórcio microbiano marinho, utilizando planejamento experimental
- **CAPÍTULO III** - Metatranscriptoma da condição validada de destoxificação e degradação do corante têxtil RBBR

No Capítulo I foram realizadas avaliações de destoxificação, atividade enzimática, biomassa seca, descoloração e adsorção pela biomassa (para o corante) com todos os oito consórcios microbianos, a fim de selecionar o melhor consórcio destoxificador dos poluentes estudados. O consórcio três (3), composto por *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *Dietzia maris* CBMAI 705 e *Bacillus subtilis* CBMAI 707, foi selecionado e submetido à etapa de avaliação de diferentes fatores na destoxificação dos poluentes ambientais visando otimização do processo. As etapas subsequentes de otimização da destoxificação pelo consórcio três, bem como análises de metatranscriptoma, foram aplicadas para o corante têxtil RBBR, por ter sido este o poluente que apresentou resultados melhores e mais coerentes de destoxificação, além de apresentar descoloração. A avaliação da otimização da destoxificação do pireno pelo consórcio três foi realizada no âmbito do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Carla de Rezende Leme (Engenharia Ambiental, UNESP/Rio Claro) intitulado “Aplicação de consórcio microbiano marinho na destoxificação do pireno”, o qual foi desenvolvido em associação com o presente estudo.

Assim, no Capítulo II o corante RBBR foi submetido a experimentos de otimização da destoxificação e descoloração pelo consórcio três, por meio de planejamento experimental, sendo dois do tipo Plackett-Burman e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual foi possível avaliar a influência de diversas variáveis neste processo. O experimento de validação do ensaio que apresentou o melhor resultado de destoxificação (ensaio dois do segundo planejamento do tipo Plackett-Burman) foi, novamente, submetido a análises de atividade enzimática (enzimas ligninolíticas), descoloração, adsorção pela biomassa, biomassa seca, bem como avaliação de possível degradação do corante pela técnica de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).

Complementarmente, foram realizadas no Capítulo III, para concluir o estudo de destoxificação e degradação do corante RBBR, análises do metatranscriptoma do consórcio três, após cultivo nas condições otimizadas de destoxificação na presença e na ausência do poluente (controle). Com o sequenciamento do RNA extraído das amostras supracitadas, foi possível observar a presença ou não de enzimas envolvidas na degradação de poluentes ambientais (como as ligninolíticas, as da via da citocromo P450, dioxigenases, entre outras).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Micro-organismos de origem marinha aplicados à biorremediação de poluentes ambientais

A biorremediação é uma abordagem promissora para o controle e destruição de compostos orgânicos (OBEROI; PHILIP, 2017). Os processos ideais de biodegradação levam à mineralização completa desses compostos, ou seja, à CO_2 e H_2O , embora existam as degradações parciais ou ainda simplesmente a biotransformação de um composto em alguns respectivos derivados (CERNIGLIA, 1992; CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001). Uma característica importante da biorremediação é que ela geralmente ocorre naturalmente em ambientes abertos não-estéreis que contêm uma variedade de organismos (WATANABE, 2001). Nesse contexto, a degradação microbiana representa a principal via responsável pela recuperação de ambientes contaminados (HUGHES et al., 1997).

A eficácia da biodegradação é frequentemente determinada em termos da diminuição da concentração do contaminante, o que, muitas vezes, não está diretamente relacionado com a diminuição da atividade biológica (toxicidade) do mesmo. Em muitos casos, a transformação biológica do poluente resulta na formação de metabólitos intermediários que podem ser mais tóxicos do que o composto original, mesmo que se apresentem em pequenas concentrações. Para avaliar a eficiência da biodegradação, é mais confiável a determinação da redução da toxicidade do que a quantificação da concentração residual do composto poluente em questão. Desta forma, é importante, para a determinação da biodegradação de poluentes orgânicos, combinar análises químicas e testes de toxicidade (OBEROI; PHILIP, 2017).

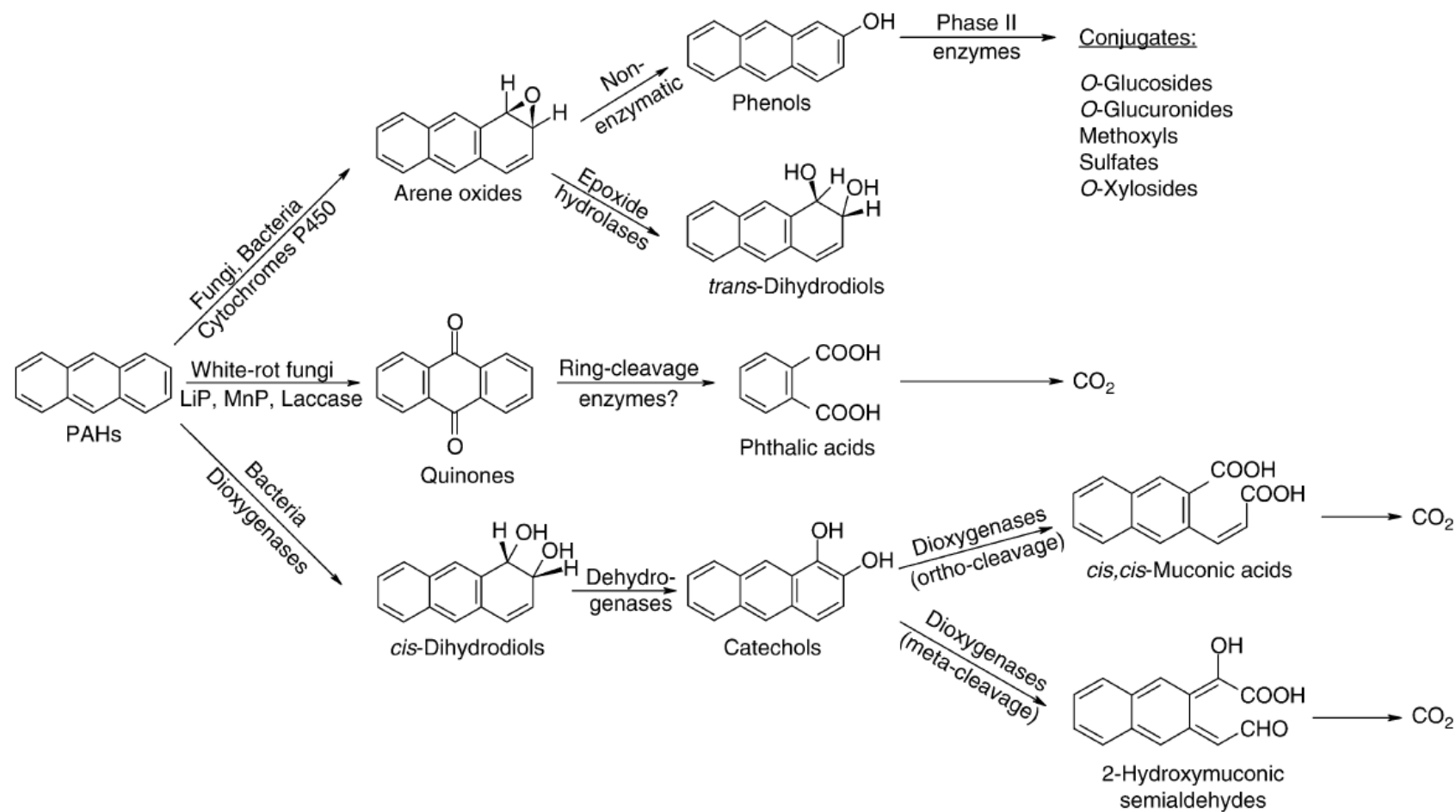
Fungos derivados de ambiente marinho são capazes de produzir metabólitos secundários biologicamente ativos, diferentes dos produzidos pelos seus homólogos terrestres, pois estão adaptados à salinidade e a outras condições adversas particulares destes ambientes (BUGNI; IRELAND, 2004; SALEEM et al., 2007), constituindo, dessa forma, recursos genéticos microbianos importantes na biorremediação de ambientes ou processos salinos. Entretanto, estudos desse grupo de micro-organismos como fonte potencial de degradação de poluentes ambientais são ainda escassos (DA SILVA et al., 2008).

Fungos ligninolíticos podem oxidar compostos orgânicos poluentes, pois produzem um complexo enzimático extracelular não-específico que é normalmente utilizado para a despolimerização da lignina. Dentre as enzimas extracelulares produzidas por fungos filamentosos, o sistema ligninolítico é de grande importância na biorremediação ambiental e é produzido, principalmente, por fungos basidiomicetos de podridão branca (*white-rot fungi*). As principais enzimas responsáveis pela degradação da lignina são a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP) e as lacases (KARIGAR; RAO, 2011), as quais possuem também grande potencial para aplicações industriais (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Essa via metabólica gera quinonas que, após a fissão do anel aromático, são metabolizadas a CO₂ e H₂O (CERNIGLIA, 1997).

Outra via metabólica conhecida para degradação de poluentes orgânicos presente em fungos envolve a hidroxilação do composto pela enzima citocromo P-450 mono-oxigenase, mediante uma sequência de reações que é semelhante às que estão envolvidas no metabolismo de mamíferos (CAPOTORTI et al., 2004; HARITASH; KAUSHIK, 2009). Esta via é também utilizada por muitos fungos não-ligninolíticos que podem, efetivamente, degradar HPAs (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001). Estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa da Profa. Lara D. Sette (UNESP, Rio Claro) têm revelado o potencial dos fungos marinhos para produção de enzimas ligninolíticas e degradação de poluentes ambientais (BONUGLI-SANTOS et al., 2010, 2015, 2016, BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010, 2012; MAGRINI, 2012; MAINARDI, 2015; PASSARINI; SETTE; RODRIGUES, 2011; PASSARINI et al., 2011, 2015; VASCONCELOS, 2015).

As bactérias utilizam oxigenases para a degradação aeróbica de hidrocarbonetos. Essas enzimas catalisam a adição de oxigênio molecular ao substrato. As dioxigenases catalisam a adição de dois grupos hidroxil, enquanto as mono-oxigenases catalisam a introdução de um átomo de oxigênio na molécula do hidrocarboneto (FUENTES et al., 2014). Esse mecanismo resulta na formação de diidrodiol, o qual será desidrogenado, formando outros compostos intermediários que poderão ser metabolizados até CO₂ e H₂O (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Na Figura 1 está apresentado o esquema de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) pelas vias acima mencionadas.

Figura 1. Vias propostas para o catabolismo microbiano de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.



Fonte: Cerniglia e Sutherland (2010)

2.2. Poluentes ambientais

Um dos maiores problemas que tem sido enfrentado ao longo do século 21 envolve a questão da poluição ambiental. Diversas atividades antropogênicas produzem e liberam compostos orgânicos nocivos ao ambiente (DASH et al., 2013). Assim, é extremamente necessária a realização de estudos que permitam conhecer os mecanismos que envolvem a degradação e a destoxificação desses compostos.

2.2.1. Poluentes ambientais empregados neste trabalho

2.2.1.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

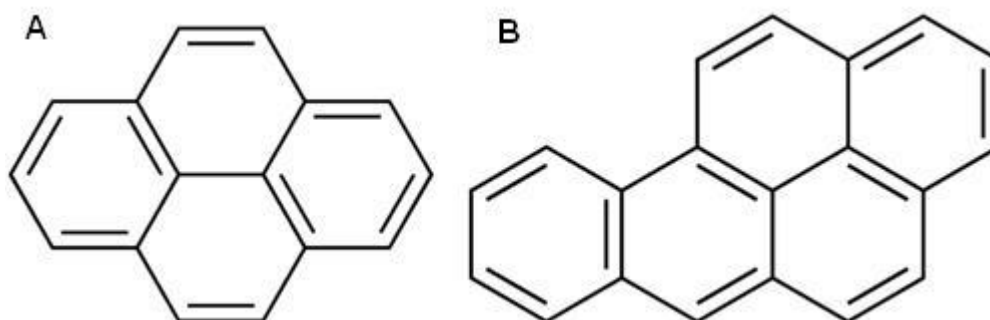
Os HPAs constituem uma importante classe de produtos químicos tóxicos, compostos por dois ou mais anéis aromáticos, de ocorrência em diferentes ecossistemas e considerados poluentes prioritários, devido à sua potencial toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (CERNIGLIA, 1997; KEITH; TELLIARD, 1979). Os HPAs de baixo peso molecular (aqueles que contêm menos de quatro anéis de benzeno) são altamente tóxicos, com efeitos sobre a reprodução e mortalidade de animais aquáticos, enquanto os HPAs de elevado peso molecular (contendo quatro ou mais anéis de benzeno) são mutagênicos e carcinogênicos. Devido à sua natureza hidrofóbica, a maioria dos HPAs liga-se às partículas de solo e sedimentos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, podendo se acumular na cadeia alimentar (GAN; LAU; NG, 2009). Esses compostos são de intensa preocupação pública quanto a sua persistência no ambiente, bem como pelos efeitos potencialmente nocivos à saúde humana (KIM et al., 2013).

Os HPAs podem ser classificados conforme sua origem antropogênica no ambiente, sendo por meio de fontes pirogênicas ou petrogênicas. HPAs de origem pirogênica são oriundos da combustão incompleta de matéria orgânica, como madeiras, combustível fóssil, asfalto, entre outros. Petróleo cru e refinado consistem em fontes petrogênicas de HPAs (LIU et al., 2009). Devido ao impacto sobre a saúde e o ambiente, os HPAs, incluindo o naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno e benzo[a]pireno, são considerados um dos maiores grupos de compostos poluentes ambientais (LIU et al., 2009).

Pireno e benzo[a]pireno são compostos de elevado peso molecular, que se acumulam em sedimentos devido à sua limitada solubilidade em água e alta afinidade para material particulado (PATROLECCO et al., 2010). As moléculas

desses compostos (Figuras 2A e 2B) são recalcitrantes e tem uma meia-vida longa, dependendo das condições avaliadas, variando de 19,4 dias a 630 dias e 211 dias a mais de 1400 dias, respectivamente (SHUTTLEWORTH; CERNIGLIA, 1995). Ambos são classificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) como poluentes prioritários (HARMENS et al., 2013).

Figura 2. Estrutura molecular do pireno (A) e benzo[a]pireno (B).



Fonte: SIGMA ALDRICH (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/>).

2.2.1.2. Óleo Diesel

O óleo diesel é um derivado de petróleo, constituído por uma mistura complexa de alcanos e compostos aromáticos que, frequentemente, são reportados como contaminantes de solo decorrentes de derrames acidentais. Este composto pode ser biodegradado pelos micro-organismos ligninolíticos de solo (DE QUEIROZ BAPTISTA et al., 2012) em processos de biorremediação combinados com bioventilação, bioestimulação e bioaugmentação (LUZ et al., 2011).

O diesel é o combustível de escolha para veículos de transporte de grande porte. O combustível, bem como seus produtos de combustão, representam grande parte das toxinas que pessoas e animais estão expostas no meio urbano e rural (KRIVOSHTO et al., 2008). Além disso, a corrosão e vazamentos em tanques de armazenamento em postos de combustíveis (BENTO; GAYLARDE, 2001) e rompimento de oleodutos são importantes fontes de contaminação ambiental, podendo atingir as águas subterrâneas (DANIELOPOL et al., 2003).

Em um estudo de solo contendo hidrocarbonetos alifáticos (C_{10} – C_{40} alcanos) derivados de petróleo foi observada a meia-vida de, aproximadamente, 450 dias para esses compostos sem nenhuma alteração do ambiente. Já em diferentes

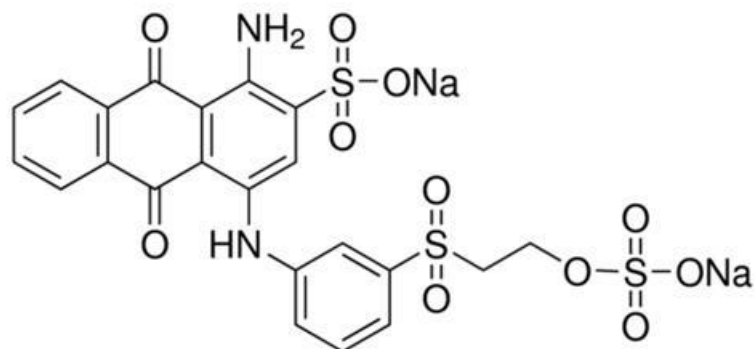
condições experimentais de biorremediação, houve redução da meia-vida em, aproximadamente, 70% (KURÁŇ et al., 2014).

2.2.1.3. Corante têxtil Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

Atualmente, são conhecidos mais de 10 mil diferentes corantes e pigmentos que são utilizados extensivamente em diferentes setores industriais, incluindo indústrias têxteis, alimentícias, cosméticas e de fotografia (RADAEI; ALAVI MOGHADDAM; ARAMI, 2014). Esses compostos são considerados xenobióticos recalcitrantes e podem ser de difícil remoção do ambiente e dos efluentes (GARRIDO-BAZÁN et al., 2016), devido às características de estabilidade à temperatura, à exposição luminosa e ao ataque de micro-organismos (LU et al., 2016). A indústria têxtil se configura como uma importante atividade em âmbito mundial e é uma das mais poluidoras, liberando no ambiente grandes quantidades de efluentes coloridos (HADIBARATA; YUSOFF; KRISTANTI, 2012). É amplamente conhecido que muitos corantes utilizados possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas, configurando um problema para a saúde do homem e do ambiente (SINGH; CHADHA, 2016).

Corantes têxteis são compostos orgânicos complexos que possuem anéis aromáticos em suas estruturas. Alguns corantes utilizados em indústrias têxteis são problemáticos para vários organismos aquáticos, como plantas e peixes, e podem causar problemas de saúde em humanos. Assim, são necessários métodos mais eficientes e econômicos no tratamento e na remoção da coloração de efluentes, antes de serem dispensados no ambiente, o que configura um desafio biotecnológico (KAUSHIK; MALIK, 2009; KHAN; HASAN; JHUNG, 2013; LU et al., 2016). Entre os corantes sintéticos, o RBBR (*Remazol Brilliant Blue R*), também conhecido como Azul Reativo 19, é considerado como um importante corante orgânico poluidor da indústria têxtil, devido a sua característica tóxica e recalcitrante (HADIBARATA; YUSOFF; KRISTANTI, 2012). O RBBR (Figura 3) é um corante do tipo antraquinona, derivado de antraceno (DA SILVA et al., 2008) e, estruturalmente, semelhante aos HPAs.

Figura 3. Estrutura molecular do corante têxtil RBBR.



Fonte: SIGMA ALDRICH (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/>)

2.3. Consórcios microbianos

As bactérias e fungos capazes de degradar poluentes possuem papel central na biorremediação (WATANABE, 2001). Uma ampla variedade de gêneros desses micro-organismos apresenta habilidade de degradar ou utilizar compostos orgânicos poluentes como substrato (LEAHY; COLWELL, 1990), cuja degradação leva à mineralização ou à transformação em produtos menos tóxicos, que podem ser ainda degradados, posteriormente, pela ação de outros micro-organismos (CERNIGLIA, 1992; CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001).

Em um processo de biorremediação, a biodegradação de compostos xenobióticos é resultado da ação de múltiplos organismos, que incluem bactérias, fungos e plantas (KUMAR et al., 2011). Para a efetividade do processo, o ataque enzimático, derivado de reações sequenciais de micro-organismos, converte o poluente em moléculas menos nocivas (VIDALI, 2001). Assim, na natureza, a mineralização de compostos orgânicos poluentes envolve a cooperação metabólica de distintas populações microbianas (BOONCHAN; BRITZ; STANLEY, 2000; KUMAR et al., 2011).

Tendo em vista os avanços no campo de análise proteômica, podem ser realizadas análises das relações funcionais dos micro-organismos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014). Neste contexto, as informações obtidas sobre as particularidades do RNA de um conjunto de organismos, em um momento específico (técnica conhecida como metatranscriptômica (PARRO; PAZ, 2014)), caracteriza-se como uma importante ferramenta para a análise dos genes expressos durante a degradação/destoxificação de poluentes ambientais, permitindo estabelecer

possíveis rotas metabólicas dos micro-organismos presentes nos consórcios microbianos, durante o processo degradativo, um tema ainda pouco abordado na literatura.

Estudos recentes empregando sequenciamento de nova geração (NGS), em análises de metatranscriptoma, têm se mostrado úteis em avaliar a fração ativa de comunidades e suas respostas funcionais em diversas condições ambientais (TRIPATHY et al., 2016).

De acordo com Hong et al. (2016), são escassos os estudos de transcriptoma na análise de degradação de hidrocarbonetos. Embora a regulação da expressão gênica seja complicada e limitada a genes e rotas específicas, análises de transcriptomas fornecem uma visão geral do genoma e possibilitam a identificação de genes funcionais, gerando perfis de expressão gênica de organismos sob condições específicas, como por exemplo, na degradação de hidrocarbonetos (HONG et al., 2016).

2.4. Análises de toxicidade

Na busca por ferramentas eficazes para estimar o risco de substâncias orgânicas ou inorgânicas liberadas no ambiente pela ação do homem, têm sido realizadas análises de toxicidade aguda em organismos de diversos níveis tróficos, tais como bactérias, microcrustáceos, algas e plantas (GIROTTI et al., 2008).

2.4.1. *Artemia* sp.

Artemia é um gênero de microcrustáceo zooplânctônico encontrado em uma grande variedade de sistemas aquáticos, de pântanos a lagos, servindo de alimento para peixes (BUSTOS-OBREGON; VARGAS, 2010). Por serem organismos filtradores, possuem elevada interação com o ambiente aquático, incluindo a exposição a poluentes ambientais. Larvas de *Artemia* sp. são sensíveis a substâncias tóxicas (MILHEM; AL-HIYASAT; DARMANI, 2008) e são comumente empregadas em ensaios ecotoxicológicos. Algumas vantagens em testes com *Artemia* sp. são o baixo custo, economia de tempo e a não necessidade de equipamentos especiais (ALMEIDA; CORSO, 2014).

2.4.2. Microtox

A utilização de bactérias para ensaios de toxicidade é considerada vantajosa devido à economia, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade. Bactérias luminescentes são geralmente a escolha primária em bateria de testes que envolvem grande número de amostras. O *Vibrio fischeri*, empregado em análises com o equipamento luminômetro Microtox, é a bactéria luminescente mais utilizada para análises de toxicidade aguda, por ser bastante sensível a uma gama de compostos químicos, em comparação com outros métodos de avaliação, incluindo os químicos ou de inibição enzimática (GIROTTI et al., 2008).

2.5. Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma abordagem estatística (RODRIGUES; MADEIRA; BOAVENTURA, 2009) que possibilita avaliar a influência de diversas variáveis independentes (LEVIN; FORCHIASSIN; VIALE, 2005) na resposta de uma variável dependente em um processo, permitindo, além da avaliação da interação entre as variáveis, a diminuição do número de experimentos realizados e, conseqüentemente, dos custos, bem como economia de tempo (BALLANTYNE; VAN OORSCHOT; MITCHELL, 2008).

Estudos que empregaram o desenho experimental na otimização de degradação de poluentes ambientais ressaltam a eficiência desta abordagem. Bonugli-Santos et al. (2016) demonstraram que na biodegradação do corante Preto Reativo 5 pelo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063, o emprego do planejamento experimental, sob condições salinas, resultou em elevada taxa de degradação (98 %) e descoloração (94 %), após sete dias de experimento, sem a geração de compostos mutagênicos.

Shuib et al. (2016) avaliaram a degradação do corante RBBR pelo fungo basidiomiceto *Marasmius cladophyllus* MS8, utilizando planejamento experimental do tipo Plackett-Burman. Das onze variáveis analisadas, os autores ressaltaram a influência de apenas quatro na degradação do corante e atingiram valores de 91 % de remoção em solo, após 15 dias de experimento.

De acordo com Magrini (2012), o planejamento experimental e sua análise estatística mostraram ser uma ferramenta importante para os estudos de

degradação dos HPAs pireno e benzo[a]pireno pelo fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, agregando confiabilidade aos resultados.

A aplicação do delineamento experimental na otimização do processo de degradação de pireno pelo fungo *Chaunopycnis alba* CBMAI 1346 foi eficiente, uma vez que houve um aumento de cerca de 1,5 vezes (33 %) na degradação do HPA pelo fungo, atingindo 94,54 % de degradação (VASCONCELOS, 2015).

No estudo conduzido por Duarte (2016), referente à destoxificação de óleo diesel e petróleo por consórcios microbianos de origem marinha, o planejamento experimental e sua análise estatística permitiram estabelecer condições mais adequadas para a atuação dos micro-organismos do consórcio (*Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Cryptococcus laurentii* CRM 707), o qual foi capaz de destoxificar cerca de 80 % do óleo diesel (2 %), após 21 dias de cultivo, quando incubado apenas com extrato de malte como fonte de carbono adicional.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de consórcios microbianos constituídos por fungos filamentosos isolados de invertebrados marinhos e bactérias recuperadas de reservatório de petróleo na destoxificação de poluentes ambientais.

3.2. Objetivos específicos

- Estruturar os consórcios microbianos e realizar análises de antagonismo, bem como realizar a seleção do melhor consórcio, considerando a análise de destoxificação dos poluentes ambientais (corante RBBR, óleo diesel e HPAs), descoloração e adsorção do corante pela biomassa microbiana, biomassa seca e atividade de enzimas ligninolíticas.
- Otimizar o processo de destoxificação/descoloração do corante têxtil RBBR por meio de desenho experimental, avaliando a influência de diferentes fatores.
- Validar a melhor condição de destoxificação/descoloração obtida, assim como realizar ensaios complementares de adsorção pela biomassa, biomassa seca e atividade de enzimas ligninolíticas.
- Avaliar a degradação do corante RBBR nas condições otimizadas de destoxificação/descoloração, utilizando espectroscopia (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR).
- Analisar a expressão de genes de enzimas possivelmente envolvidas na degradação de poluentes orgânicos, a partir da análise de metatranscriptoma do consórcio selecionado, cultivado nas condições otimizadas de destoxificação/descoloração do corante RBBR (tanto na presença quanto na ausência do corante).

CAPÍTULO I

ESTRUTURAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS E SELEÇÃO DO MELHOR CONSÓRCIO DESTOXIFICADOR DE POLUENTES AMBIENTAIS

1. INTRODUÇÃO

Os poluentes orgânicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), corantes têxteis, pesticidas e metais pesados são liberados continuamente no ambiente, derivados de atividade antrópica. Muitos desses poluentes são recalcitrantes, interferindo nos processos naturais de regeneração do ambiente e podendo se acumular especialmente em solos, sedimentos e material particulado (BOUHAJJA; AGATHOS; GEORGE, 2016).

A biorremediação pode ser definida como o processo pelo qual os micro-organismos são estimulados a degradar rapidamente os poluentes orgânicos nocivos para níveis ambientalmente seguros de solos, sedimentos, substâncias, materiais e águas subterrâneas (SINGH, 2014).

Os micro-organismos não possuem mecanismos metabólicos para mineralizar sozinhos a maioria dos poluentes ambientais. A mineralização completa, processo em que o poluente é transformado em CO₂ e H₂O, resulta de processos degradativos sequenciais realizados por um consórcio microbiano que envolve sinergismo e co-metabolismo (SINGH, 2014).

Desta forma, diante da problemática dos poluentes ambientais e da possibilidade de utilização de micro-organismos na destoxificação e degradação de tais compostos, a etapa inicial deste trabalho objetivou a estruturação de consórcios microbianos e seleção do consórcio com melhor capacidade para destoxificar poluentes ambientais, incluindo o corante têxtil RBBR, o óleo diesel e os HPAs benzo[a]pireno e pireno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismos

Neste trabalho, foram utilizados quatro fungos filamentosos previamente isolados e estudados quanto à capacidade de degradação dos HPAs pireno e benzo[a]pireno (isoladamente), no âmbito dos projetos Fapesp 05/51213-8 “Fungos

derivados de ambientes marinhos: isolamento, caracterização taxonômica e avaliação do potencial biotecnológico” coordenado pela Profa. Dra. Lara Sette (UNESP/RC) e Temáticos Fapesp 05/60175-2 e 10/50190-2, “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados” e “Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades anti-virais, anti-Leishmania e anti-inflamatória”, coordenados pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck (USP-SC) (Tabela 1). Também foram empregadas duas bactérias recuperadas de reservatório de petróleo (*off-shore*), previamente selecionadas pela capacidade de degradar hidrocarbonetos e/ou produzir biossurfactantes (EPS), no âmbito do Projeto PETROBRÁS - Estudo Multidisciplinar de Biodegradação, coordenado pelo Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Reis (IQ/ UNICAMP) (Tabela 1).

Tabela 1. Micro-organismos selecionados para o estabelecimento dos consórcios – descrição de suas propriedades e fonte de isolamento.

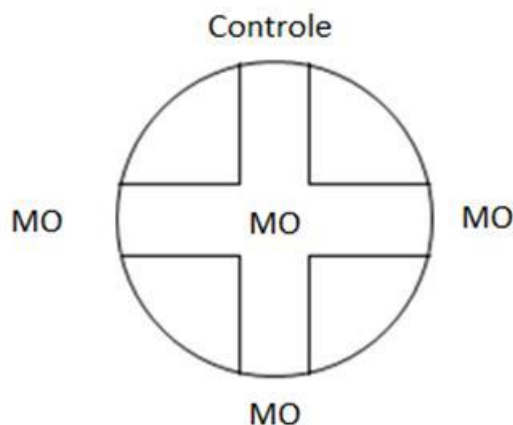
Micro-organismo	Fonte de isolamento	Propriedades	Referências
Fungos filamentosos			
(1) <i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847	<i>Mussismilia hispida</i> (cnidário)	Degradação de pireno e Bap	(PASSARINI et al., 2011)
		Atividade ligninolítica	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010)
(2) <i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBMAI 849	<i>Palythoa variabilis</i> (cnidário)	Degradação de pireno e Bap	(PASSARINI et al., 2011)
		Atividade ligninolítica	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010)
(3) <i>Cladosporium cladosporioides</i> CBMAI 857	<i>Palythoa caribaeorum</i> (cnidário)	Degradação de pireno e Bap	(PASSARINI et al., 2011)
		Atividade ligninolítica	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010)

(4) <i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>Amphimedon viride</i> (esponja)	Produção de Lacase	(BONUGLI-SANTOS et al., 2010)
		Atividade ligninolítica e descoloração de corante têxtil	(BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012)
		Degradação de pireno e Bap	Magrini (2012)
Bactérias			
(5) <i>Bacillus subtilis</i> CBMAI 707	Petróleo altamente degradado	Degradação de fenantreno	(DELLAGNEZZE et al., 2016; VASCONCELLOS et al., 2011)
		Produção de EPS	
(6) <i>Dietzia maris</i> CBMAI 705	Petróleo altamente degradado	Degradação de <i>n</i> -octadecano e de fenantreno + <i>n</i> -octadecano	(DELLAGNEZZE et al., 2014; VASCONCELLOS et al., 2011)

2.2. Teste de inibição entre micro-organismos propostos para comporem os consórcios microbianos

O teste de inibição (antagonismo) foi realizado em placas contendo ágar malte 2 % (MA2: 20 g/L de extrato de malte e 15 g/L de ágar) para os fungos filamentosos e ágar nutriente (NA: peptona 5 g/L; NaCl 5 g/L; extrato de carne 1,5 g/L; extrato de levedura 1,5 g/L e ágar 15 g/L) para as bactérias. Para tanto, as placas contendo o meio de cultura foram cortadas em formato de cruz com auxílio de um bisturi (Figura 4). Ao centro e nas extremidades os micro-organismos (MO) foram inoculados, deixando uma das extremidades livre como controle do crescimento do micro-organismo central. As placas foram incubadas por sete dias a 28 °C.

Figura 4. Esquema demonstrativo do teste de inibição entre os micro-organismos selecionados para a estruturação dos consórcios. No centro e nas três extremidades foram inoculados os micro-organismos, ficando uma extremidade livre (controle) para crescimento do organismo central.



2.3. Estruturação dos consórcios microbianos

Os consórcios microbianos foram estruturados, considerando as características dos micro-organismos (previamente estudadas) referentes à capacidade de degradação de poluentes ambientais, quando aplicados isoladamente, a origem de cada micro-organismo (Tabela 1) e pela interação dos micro-organismos nos testes de inibição de crescimento. Foram propostas oito combinações distintas de consórcios microbianos marinhos (Tabela 2), de forma a se obter sinergismos das atividades dos micro-organismos, para os estudos de destoxificação dos poluentes.

Tabela 2. Consórcios microbianos estruturados em diferentes combinações e os respectivos micro-organismos constituintes.

Consórcio	Micro-organismos
1	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (5) <i>Bacillus subtilis</i>
2	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (6) <i>Dietzia maris</i>
3	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (5) <i>Bacillus subtilis</i> + (6) <i>Dietzia maris</i>
4	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (3) <i>Cladosporium cladosporioides</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (5) <i>Bacillus subtilis</i>
5	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (3) <i>Cladosporium cladosporioides</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (6) <i>Dietzia maris</i>
6	(1) <i>Mucor racemosus</i> + (3) <i>Cladosporium cladosporioides</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (5) <i>Bacillus subtilis</i> + (6) <i>Dietzia maris</i>

- | | |
|---|--|
| 7 | (1) <i>Mucor racemosus</i> + (2) <i>Aspergillus sclerotiorum</i> + (3) <i>Cladosporium cladosporioides</i> + (4) <i>Marasmiellus</i> sp. |
| 8 | (4) <i>Marasmiellus</i> sp. + (5) <i>Bacillus subtilis</i> + (6) <i>Dietzia maris</i> |
-

2.4. Cultivo dos micro-organismos e estruturação do experimento de destoxificação e descoloração dos poluentes ambientais

Os experimentos com os oito consórcios foram estruturados da seguinte maneira: os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo ágar malte 2 % (MA2), durante sete dias. Após esse tempo, dois cilindros de 0,5 cm foram transferidos para frascos Erlenmeyers contendo 10 mL de meio suplementado (ZINDER et al., 1984) com modificações (NH_4Cl 1 g/L; K_2HPO_4 0,4 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; extrato de levedura 0,5 %; 10 mL/L de solução traço em pH 7 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,17 g/L; CaCl_2 0,02 g/L; H_3BO_3 0,02 g/L; molibdato de sódio 0,01 g/L), modificada de Zeikus (1977); adicionado de glicose 1 %). Os frascos contendo os fungos foram cultivados por três dias a 28 °C, sob agitação de 140 rpm (pré-inóculo). As bactérias foram cultivadas em placa de Petri contendo ágar nutriente (NA) por 48 h a 28 °C. Após esse período, uma alçada das colônias de bactérias foi transferida para tubo de ensaio contendo 10 mL de meio (nas mesmas condições daquele utilizado para os fungos filamentosos), suplementado com 0,1 % (v/v) de solução vitamínica (2 mg biotina; 2 mg ácido fólico; 5 mg cloridrato de tiamina; 5 mg ácido nicotínico; 5 mg pantotenato de cálcio; 10 mg cloridrato de piridoxina; 0,1 mg vitamina B12 e 5 mg ácido lipoico, por litro de água deionizada), a qual foi filtrada em membrana de 0,22 μm (DE VASCONCELLOS et al., 2009). Após 24 h de cultivo a 140 rpm e 28 °C, foi medida a densidade óptica em espectrofotômetro em 600 nm e 1 mL da suspensão de células de densidade óptica de 0,4 foi considerada para compor os consórcios nos ensaios. Foram adicionados, individualmente, aos frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio suplementado e o consórcio microbiano, 500 ppm de RBBR, 1 % de óleo diesel (esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm) ou 0,02 mg/mL de BaP. Os frascos foram mantidos em incubadoras de agitação durante sete dias, a 140 rpm e 28 °C. Foram também preparados controles contendo o meio de cultivo com os micro-organismos na ausência de poluentes. Após o período de incubação, foram realizadas as análises descritas nos itens 2.5 a 2.9.

2.5. Biomassa seca

Tubos do tipo Falcon foram previamente secos em estufa a 105 °C por 18 h e a massa desses tubos foi medida e anotada. Os experimentos com os consórcios microbianos foram centrifugados por 15 min, 13416 g e 4 °C nos tubos previamente secos. O sobrenadante foi reservado e a massa de micro-organismos foi seca em estufa a 105 °C por 18 h. A massa seca (tubo + micélio secos) foi novamente medida. A biomassa seca foi determinada pela diferença entre a massa final (tubo + micro-organismos secos) e a massa inicial do tubo tipo Falcon seco.

2.6. Análise de toxicidade aguda

2.6.1. Microtox

A avaliação da destoxificação dos compostos estudados (RBBR e diesel) foi realizada por meio da análise de toxicidade aguda em Microtox 500. A técnica consiste na exposição da bactéria *Vibrio fischeri* a uma amostra, a qual acusa a toxicidade com auxílio do equipamento Microtox 500. Para tanto, foi realizada uma suspensão inicial da bactéria liofilizada em tampão de reativação (10^8 células/mL). Posteriormente, foi feita uma primeira diluição da bactéria, sendo 150 µL transferidos para 1500 µL de NaCl 2 %. A partir dessa diluição, 100 µL foram transferidos para cubetas e verificada a luminescência da bactéria (T0). Um volume de 2500 µL da amostra foi misturada com 250 µL de NaCl 22 %, e a mistura foi utilizada para a confecção de diluições seriadas (1:1). Para o controle foi utilizado NaCl 2 %. As diluições (900 µL) foram transferidas para as cubetas contendo 100 µL de bactéria. A leitura em luminômetro foi realizada em tempos de 5, 15 e 30 min. Os resultados da leitura da luminescência da bactéria *V. fischeri* foram avaliados em programa específico do equipamento Microtox 500, no qual foram gerados dados de dose-resposta e determinado o EC₅₀ (concentração que inibe em 50 % a luminescência da bactéria).

A classificação de toxicidade das amostras foi realizada de acordo com Bulich (1992), com base nos dados da Tabela 3.

Tabela 3. Classificação das faixas de toxicidade aguda segundo Bulich (1992).

Grau de Toxicidade	
EC ₅₀ (%)	Classificação
<25	Muito tóxica
25 – 50	Tóxica
51 – 75	Moderadamente tóxica
>75	Levemente tóxica

2.6.2. *Artemia* sp.

Os ovos de *Artemia* sp. foram adquiridos em estabelecimento de produtos para aquário e foram colocados em Placa de Petri (0,2 g) contendo 40 mL de água do mar artificial (ASW: MgCl₂.6H₂O (11,91), CaCl₂.2H₂O (1,66), SrCl₂.6H₂O (0,02), NaCl (26,32), Na₂SO₄ (4,41), KCl (0,75), NaHCO₃ (0,22), KBr (0,11), H₃BO₃ (0,03) em g/1,1L de água destilada) (KESTER et al., 1967). A placa foi recoberta com filme plástico (com pequenos orifícios para aeração) e colocada sob luz artificial por 48 h. Após esse tempo, as larvas eclodidas foram empregadas em ensaios de toxicidade da seguinte maneira: 10 larvas foram colocadas em contato com 3 mL de amostra do consórcio, com e sem poluente. Controles de meio suplementado na ausência e presença do poluente foram também testados. Houve correção da salinidade das amostras utilizando 10 % (v/v) de solução NaCl 30 %. Após 24 h, foi verificada a porcentagem de larvas sobreviventes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade realizada com *Artemia* sp., foram submetidos a testes estatísticos de proporcionalidade (qui-quadrado), para estimar a diferença significativa (nível de 5%) existente entre o controle (meio suplementado + poluente) e os consórcios.

Para o BaP, foi realizado o experimento de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia* sp. como indicador, tendo em vista os resultados incoerentes para esse poluente com o equipamento Microtox, devido a coloração amarelada e turbidez das amostras. Diante dos problemas enfrentados com a ausência de toxicidade de BaP, diferentes concentrações de Pireno e BaP (Pireno: 0,04 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,12

mg/mL e BaP: 0,06 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,14 mg/mL) foram, adicionalmente, avaliadas pelo teste de toxicidade com *Artemia* sp..

2.7. Atividade das enzimas ligninolíticas dos consórcios microbianos frente aos diferentes poluentes

Os caldos enzimáticos (após sete dias de experimento, a 140 rpm e 28 °C) foram obtidos por centrifugação por 15 min, 13416 *g* e 4 °C e as atividades das enzimas ligninolíticas (lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase) foram determinadas de acordo com os protocolos abaixo descritos.

2.7.1. Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na oxidação do álcool veratrílico, usado como substrato. A mistura foi composta de 0,8 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, após 10 min de reação (ARORA; GILL, 2001).

2.7.2. Manganês Peroxidase (MnP)

Esta atividade foi quantificada pelo método modificado de Wariishi, Valli e Gold (1992) com a adição de 50 μL de H_2O_2 (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50 μL de MnSO_4 (10 mM), e 0,1 mL de caldo enzimático. A formação do complexo Mn^{+3} -malonato foi acompanhada a 270 nm ($\epsilon = 11590\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), após 5 min de reação.

2.7.3. Lacase

A atividade enzimática de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbenthiiazolina (ABTS): a mistura foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03 % e 0,6 mL do caldo enzimático (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo

monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm, após 10 min de incubação a 37 °C.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U/L do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Beer-Lambert:

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t, \text{ onde:}$$

ΔA	diferença entre a absorbância final e a inicial
V	volume da reação (0,001 L em todos os casos)
10⁶	converte os mols de ε para µmols
ε	coeficiente de extinção (M ⁻¹ cm ⁻¹)
R	quantidade de caldo enzimático (L)
T	tempo de reação (min)

2.8. Descoloração do corante têxtil RBRR

As análises de descoloração do corante RBRR foram realizadas de acordo com Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2012). Para tanto, os ensaios foram centrifugados, os sobrenadantes foram diluídos em água deionizada na proporção 1:10 e as absorbâncias foram medidas em espectro de comprimento de onda variando de 400 nm a 800 nm, tanto para o controle (meio suplementado + 500 ppm de corante) quanto para os sobrenadantes dos ensaios. No pico de absorbância máxima do corante (594 nm) foi avaliado o percentual de descoloração, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

2.9. Adsorção do corante têxtil RBRR pela biomassa

Os micro-organismos foram cultivados conforme item 2.4. Ao final de três dias de pré-inóculo fúngico, os micro-organismos foram reunidos na composição dos consórcios e autoclavados por 45 min, 120 °C e 1 atm para inativação microbiana e

enzimática. O corante RBBR (500 ppm) foi adicionado e o experimento foi mantido por sete dias a 28 °C e 140 rpm. Os cultivos foram centrifugados, o sobrenadante foi diluído na proporção 1:10 e as absorbâncias foram medidas em amplo espectro (400 nm a 800 nm), tanto para o controle (meio suplementado + 500 ppm de corante) quanto para os consórcios inativados. No pico de absorbância máxima do corante (594 nm) foi avaliado o percentual de adsorção pela biomassa, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Adsorção (\%)} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste de inibição dos micro-organismos

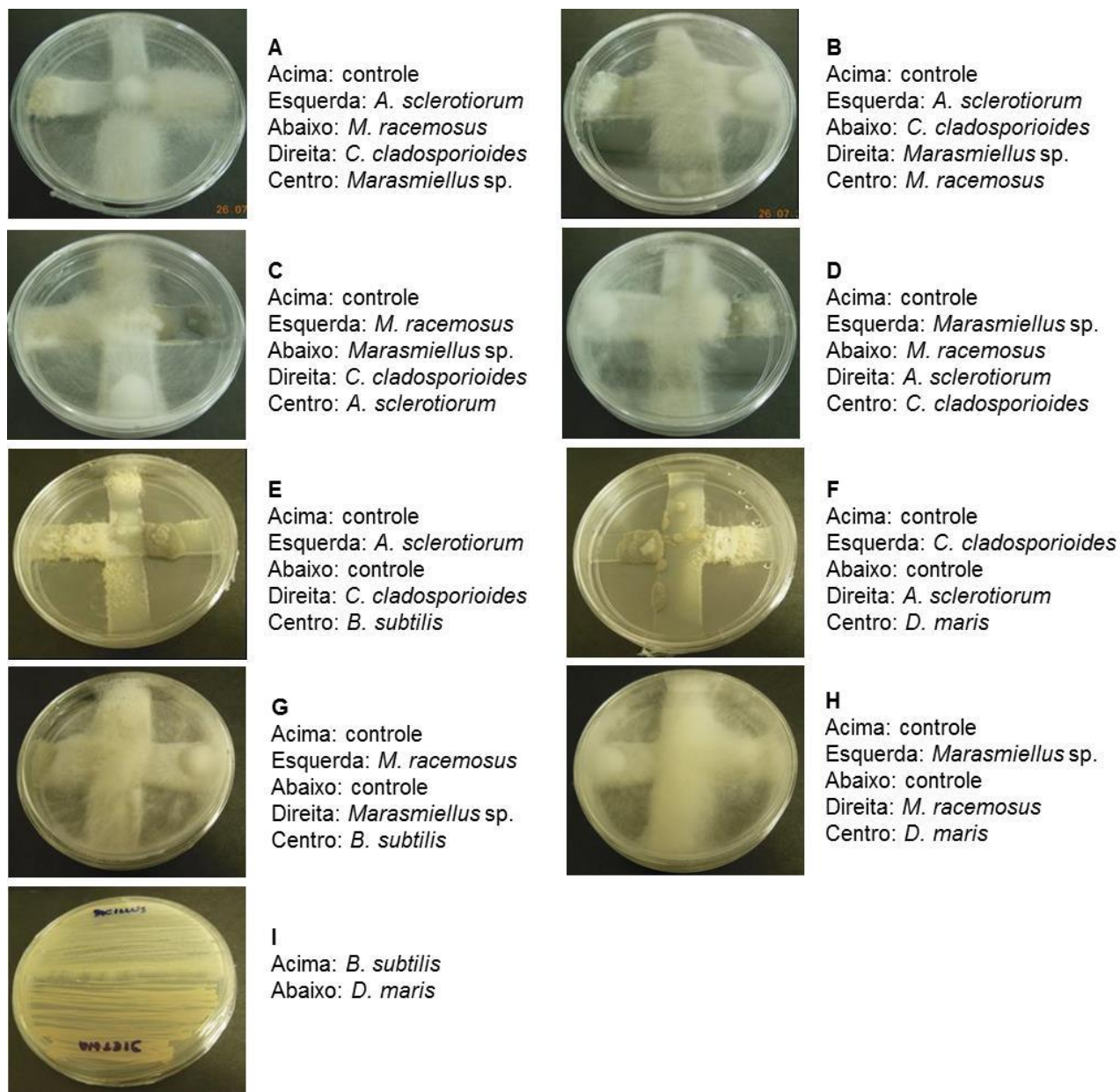
A produção de compostos antimicrobianos por micro-organismos ocorre com frequência e pode ser considerado um fator limitante nos estudos de consórcios microbianos. Assim, visando avaliação das interações microbianas antes da estruturação dos consórcios, foram realizados testes de inibição dos micro-organismos selecionados (Tabela 1).

Os resultados dos testes de inibição revelaram a boa interação entre os micro-organismos, não havendo presença de halo de inibição e permitindo a sobreposição do crescimento dos micro-organismos testados (Figura 5). Os resultados de inibição em meio sólido, revelaram que não houve restrições nas combinações microbianas a serem estruturadas nos consórcios.

Com base nos resultados dos testes de inibição microbiana (Figura 5), nas características de degradação de poluentes ambientais e a origem de cada um dos micro-organismos estudados (Tabela 1), foram propostas oito combinações distintas de consórcios microbianos, as quais estão apresentadas na Tabela 2.

Após os experimentos em que os consórcios foram expostos aos poluentes ambientais propostos, foram realizadas diversas análises e os resultados estão separados em seções, de acordo com o poluente empregado.

Figura 5. Testes de inibição (antagonismo) entre os micro-organismos propostos para estruturação dos consórcios. Todos os quatro fungos filamentosos e as duas bactérias foram testados entre si em meio malte 2 % (A-H) e as duas bactérias em ágar nutriente (I).



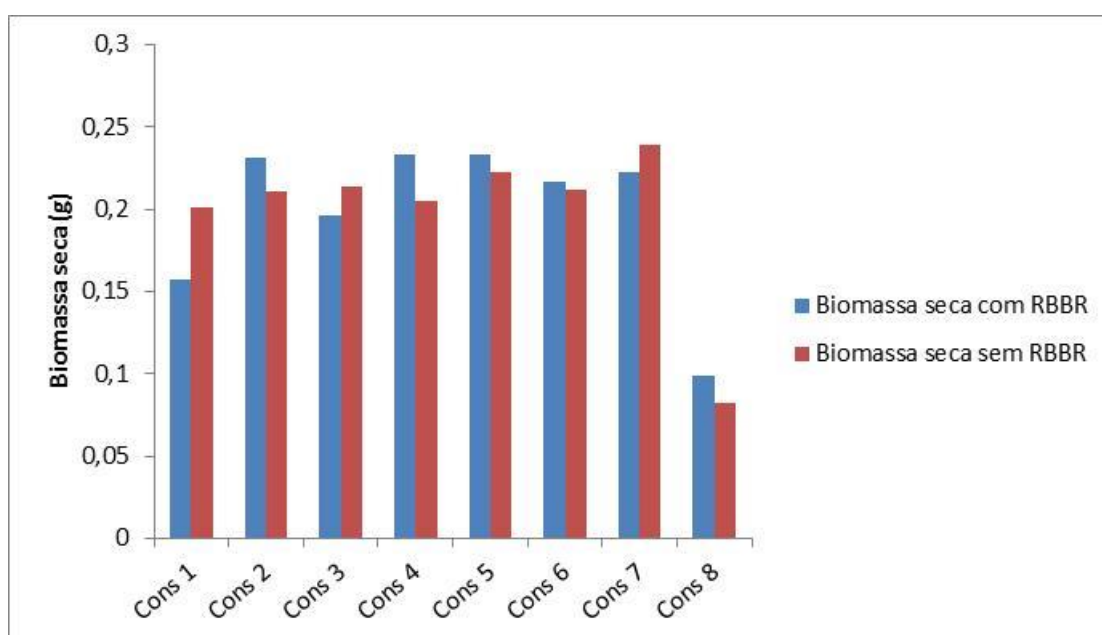
3.2. Corante têxtil RBBR (500 ppm)

3.2.1. Biomassa seca

Os resultados da biomassa seca dos consórcios microbianos na presença e ausência do corante RBBR estão apresentados na Figura 6. Os consórcios 2, 4, 5, 6 e 8 apresentaram uma maior quantidade de biomassa nos experimentos com o corante, quando comparado aos experimentos sem o corante. O contrário foi observado para os consórcios 1, 3 e 7. Pequenas diferenças podem ser explicadas

pelas alterações do inóculo inicial, principalmente para os fungos filamentosos, os quais podem ter sido recuperados de uma área da Placa de Petri com mais ou menos esporos ou micélios, favorecendo ou não o desenvolvimento de uma maior massa micelial. Diferenças mais significativas (consórcio 1), podem estar relacionadas com uma possível inibição do crescimento dos micro-organismos em meio líquido ou intoxicação pelo poluente.

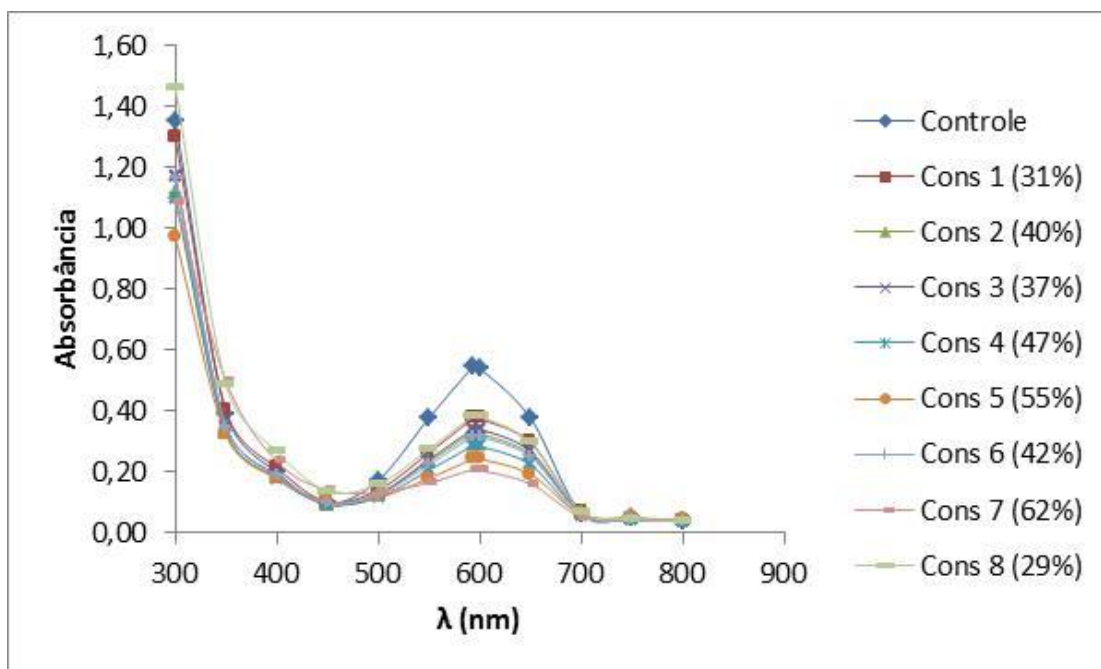
Figura 6. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência do corante RBBR.



3.2.2. Descoloração

As taxas de descoloração do corante RBBR estão apresentadas na Figura 7 e demonstraram variação de 29 % (consórcio 8) a 62 % (consórcio 7). As elevadas taxas de descoloração, em relação ao controle (meio suplementado + RBBR 500, sem os inóculos microbianos), indicam a influência do metabolismo microbiano por meio da produção de enzimas envolvidas no processo de degradação de poluentes ou uma possível adsorção do corante na biomassa microbiana.

Figura 7. Percentual de descoloração do corante têxtil RBBR pelos consórcios microbianos, comparado aos resultados do teste controle (constituído de RBBR 500 ppm).

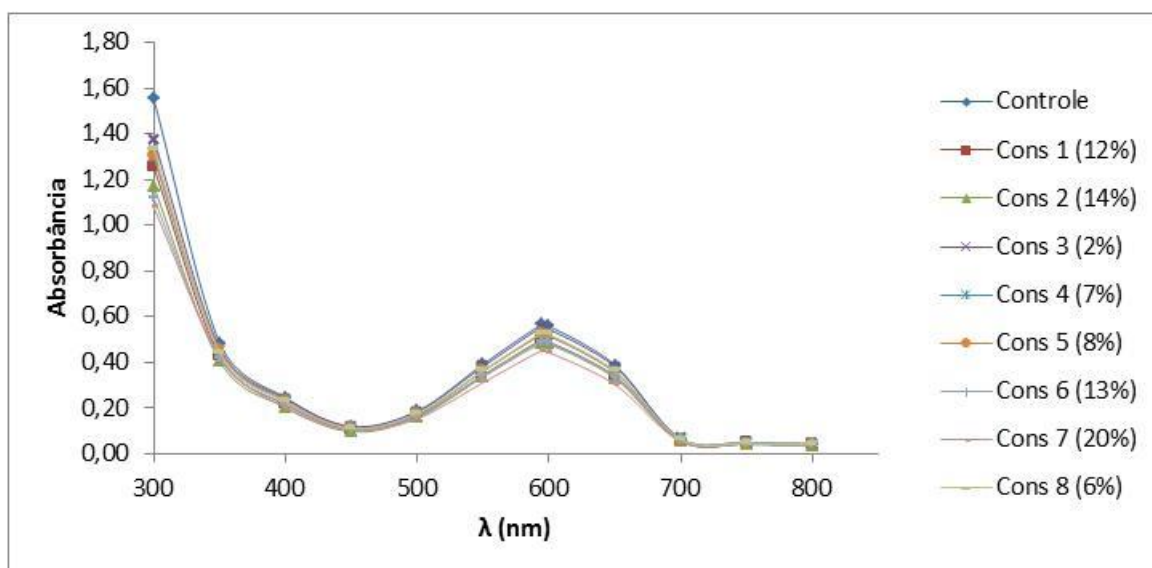


Visando comprovação da descoloração enzimática do corante RBBR, experimentos de adsorção pela biomassa foram realizados e os resultados estão apresentados a seguir.

3.2.3. Adsorção pela biomassa

As taxas de adsorção estão apresentadas na Figura 8 e variaram de 2 % (consórcio 3) a 20 % (consórcio 7). A análise do percentual de descoloração real apresentado na Tabela 4 (diferença entre o percentual de descoloração “A” e de adsorção pela biomassa “B”) demonstram que as taxas de degradação do corante têxtil ocorrem em maior escala do que a adsorção pela biomassa, sugerindo uma possível ação de enzimas microbianas no processo de descoloração do composto estudado.

Figura 8. Percentual de adsorção do corante têxtil RBBR pela biomassa morta dos consórcios microbianos, comparado ao teste com controle (contendo RBBR 500 ppm).



Os consórcios 3, 4, 5 e 7 resultaram em uma descoloração real de 35 a 47 %. Esses resultados alcançados são promissores, visto que as condições de cultivo são primárias e esse percentual pode ser otimizado, em condições de planejamento experimental.

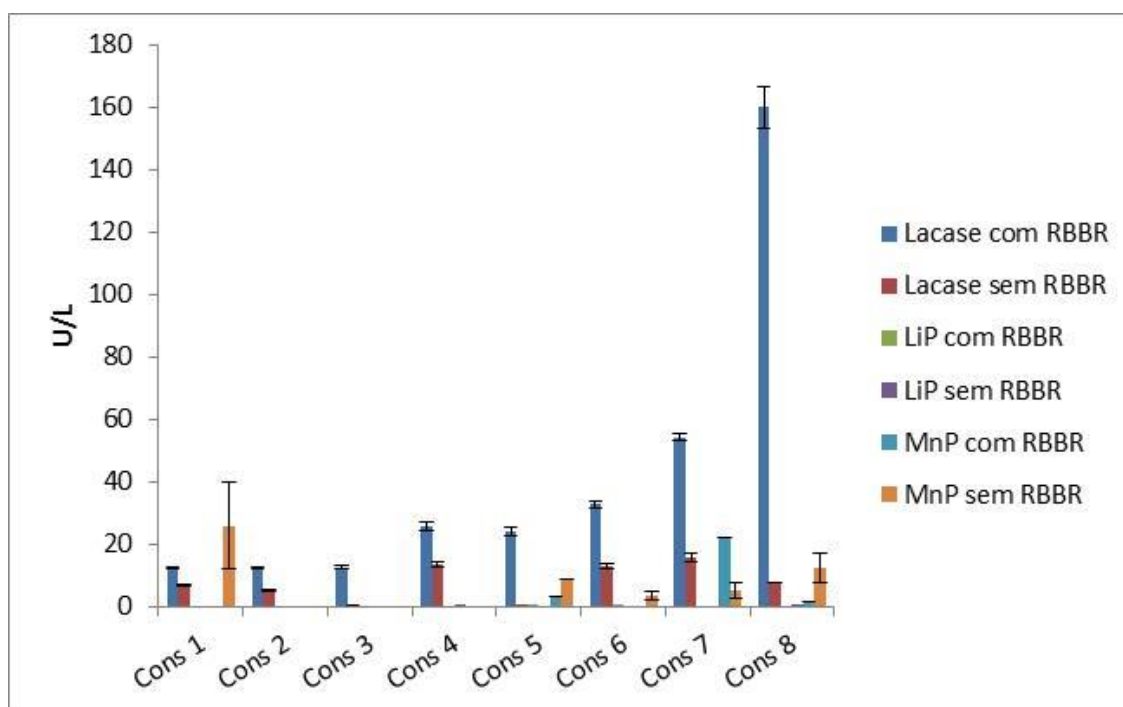
Tabela 4. Diferença entre o percentual de descoloração e adsorção (pela biomassa morta) do corante têxtil RBBR – descoloração real.

	Descoloração (%) A	Adsorção (%) B	Descoloração real (%) A - B
Consórcio 1	31	12	19
Consórcio 2	40	14	26
Consórcio 3	37	2	35
Consórcio 4	47	7	40
Consórcio 5	55	8	47
Consórcio 6	42	13	29
Consórcio 7	62	20	42
Consórcio 8	29	6	23

3.2.4. Atividade enzimática

Os resultados das análises das atividades das enzimas ligninolíticas (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) estão apresentados na Figura 9. Foi observada atividade da enzima lacase em todos os oito consórcios, sendo os maiores valores registrados para os consórcios onde o corante RBRR estava presente, indicando a indução desta enzima na presença do poluente e sugerindo a sua possível participação no processo de descoloração. O consórcio 8 apresentou atividade mais expressiva de lacase (160 U/L). Para as outras enzimas ligninolíticas (LiP e MnP), as atividades foram muito baixas ou ausentes.

Figura 9. Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, LiP e MnP) dos ensaios contendo os consórcios microbianos na presença e ausência do corante têxtil RBRR.



3.2.5. Toxicidade aguda - Microtox

Os resultados de toxicidade aguda (EC_{50}), após a exposição dos experimentos contendo corante têxtil RBRR à bactéria *V. fischeri*, para o tempo de 30 min, estão apresentados na Tabela 5. As análises de toxicidade em equipamento Microtox foram satisfatórias para o corante RBRR, sendo possível obter resultados coerentes entre o controle e os bioprocessos.

De acordo com a classificação adotada por Bulich (1992), o controle (meio suplementado + RBBR) foi classificado como muito tóxico, enquanto os consórcios 4 e 8 foram classificados como tóxicos, os consórcios 1, 2, 6 e 7 como moderadamente tóxicos e os consórcios 3 e 5 como levemente tóxicos (Tabela 3).

Na análise comparativa da toxicidade e descoloração real do corante (Tabela 4) a relação entre descoloração e destoxificação foi verificada para o consórcio 3, 5 e 7, os quais apresentaram toxicidade leve e moderada e descoloração entre 35 e 47 %. Entretanto, esta correlação não foi evidenciada no consórcio 4, o qual mesmo apresentando uma boa taxa de descoloração (40 %) foi classificado como tóxico. Em adição, para os consórcios 1, 2 e 6, considerados moderadamente tóxicos as porcentagens de descoloração não foram tão elevadas (19, 26 e 29 %, respectivamente).

Tabela 5. Toxicidade aguda (EC_{50} - %) das amostras representativas dos consórcios microbianos contendo corante têxtil RBBR (destaque para o consórcio 3).

Amostra	EC_{50} (%)
Controle	9,0
Consórcio 1	63,0
Consórcio 2	55,0
Consórcio 3	96,0
Consórcio 4	38,0
Consórcio 5	76,0
Consórcio 6	58,0
Consórcio 7	61,0
Consórcio 8	40,0

Com base nas análises de toxicidade aguda, pode-se inferir que os consórcios que apresentaram toxicidade moderada a leve degradaram o corante em intermediários pouco tóxicos para esse nível trófico. O consórcio que apresentou maior destoxificação do RBBR (consórcio 3) apresentou atividade de lacase em torno de 13 U/L e descoloração de 35 %. As enzimas ligninolíticas, produzidas pelos consórcios podem ter participado nesse processo. Entretanto, a maior produção de lacase foi obtida pelo consórcio 8 (160 U/L), o qual apresentou descoloração de 23 % e foi considerado tóxico mesmo depois do bioprocessamento. Desta forma, os

resultados sugerem que outros fatores e outras rotas metabólicas devem estar envolvidos no processo de destoxificação/descoloração do corante RBBR.

Lu et al. (2016) estudaram a habilidade do fungo da podridão branca *Ganoderma* sp. En3 na descoloração de diferentes corantes têxteis (RBBR, índigo-carmin e verde metil). Para o corante RBBR em diferentes concentrações (1000, 2000, 4000, 5000, 6000 mg/L), os resultados revelaram elevados percentuais de descoloração que foram entre 83,6 e 97,0 %, após 96 h de cultivo. Os autores destacaram que as elevadas concentrações do corante RBBR utilizadas no estudo não inibiram o crescimento do fungo. Resultado similar foi também observado no presente trabalho para a maioria dos consórcios empregados. Em adição, os autores afirmaram que a enzima lacase teve um papel importante na descoloração do corante.

Em um outro estudo, Kunjadia et al. (2016) avaliaram a descoloração de três corantes (*Coralene Golden Yellow* - CGY, *Coralene Navy Blue* - CNB e *Coralene Dark Red* - CDR) em distintas concentrações (20, 50, 100 e 200 ppm) por diferentes espécies do gênero *Pleurotus*, ao longo de 10 dias de experimento. Os autores observaram que acima de 100 ppm as taxas de descoloração decaíram e atribuíram tal fato à toxicidade dos corantes que estaria influenciando o crescimento celular. As atividades de lacase e MnP para *Pleurotus* durante a descoloração foram baixas e LiP não foi produzida. Esses resultados são similares aos encontrados no presente trabalho, onde foram observados baixos níveis de atividade das enzimas ligninolíticas, sugerindo que outras rotas metabólicas possam estar envolvidas no processo de descoloração do corante. Cabe destacar que as concentrações do corante RBBR utilizadas no presente trabalho são cerca de 40 vezes maior do que a avaliada no estudo de Kunjadia et al. (2016), o que pode dificultar o processo de descoloração.

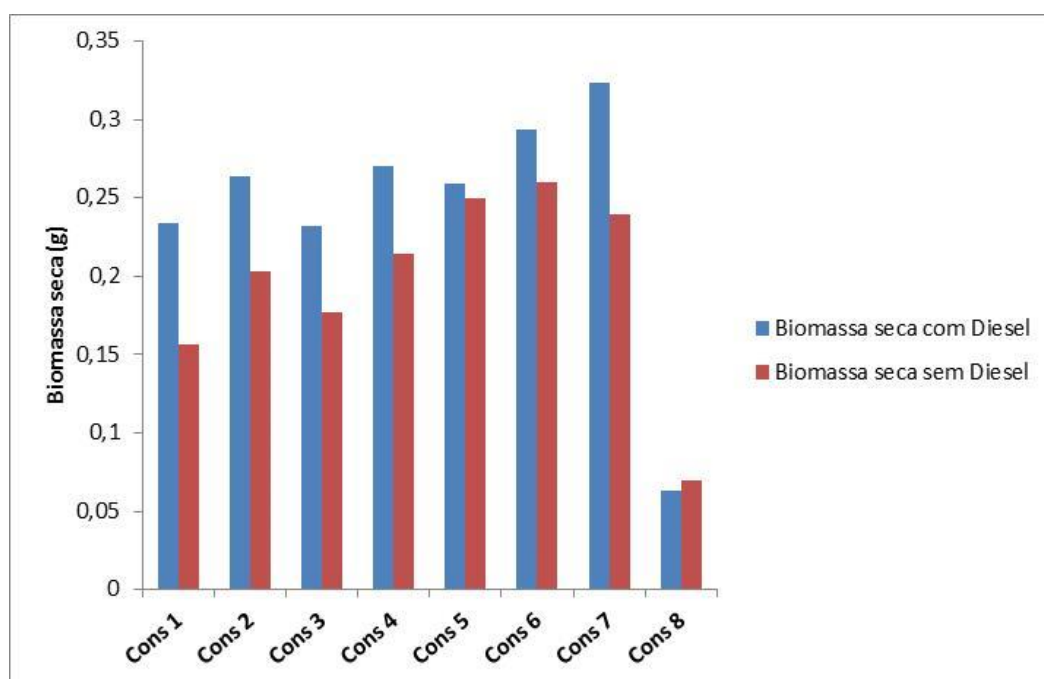
Nos trabalhos anteriormente citados os autores não avaliaram a toxicidade da solução resultante da descoloração dos corantes empregados. A análise da toxicidade é de extrema importância, pois os intermediários de degradação de um poluente ambiental, muitas vezes, apresentam toxicidade mais elevada do que a do composto parental.

3.3. Óleo diesel

3.3.1. Biomassa seca

Os resultados das análises de biomassa seca na presença e na ausência de óleo diesel estão apresentados na Figura 10 e indicam um incremento na biomassa na presença do poluente para todos os consórcios, com exceção do consórcio 8. Embora o óleo diesel seja um poluente de composição química complexa e de elevada toxicidade, sua presença não apresentou influência negativa no crescimento microbiano. Esses resultados sugerem que a formação de biomassa em ensaios contendo o poluente pode ter sido favorecida pelo consumo do diesel como fonte de carbono e energia para o crescimento e duplicação celular.

Figura 10. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência de diesel.

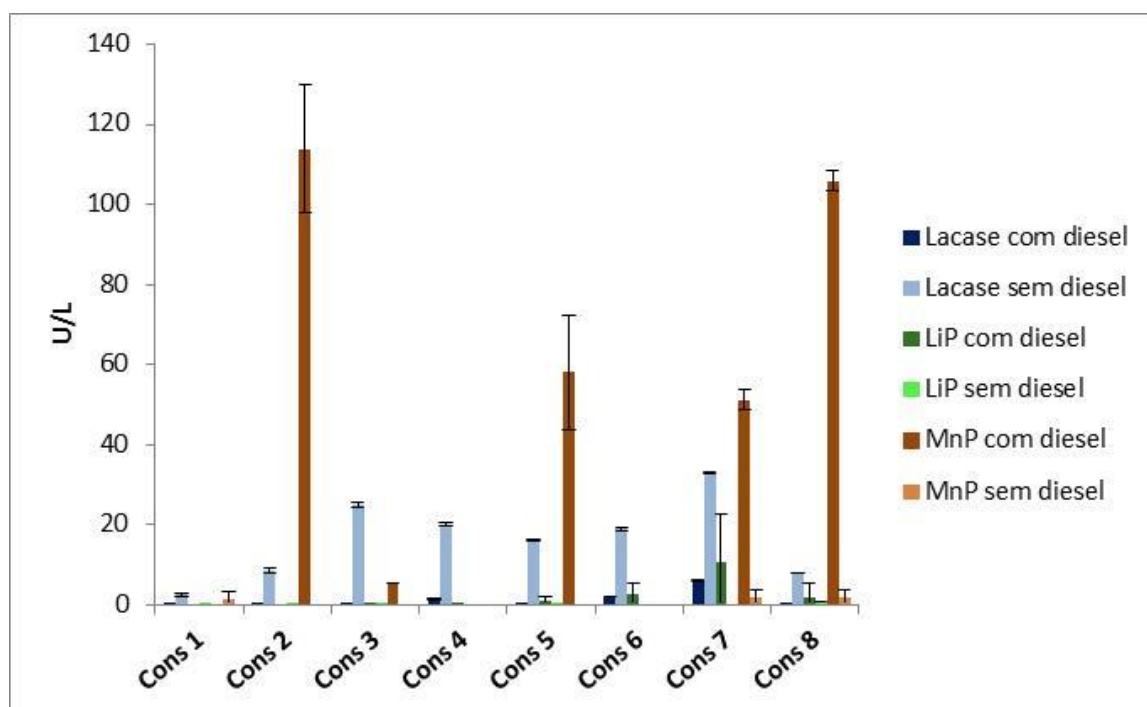


3.3.2. Atividade enzimática

As atividades enzimáticas dos consórcios na presença e ausência do óleo diesel estão apresentadas na Figura 11. Os resultados revelam um destaque para a produção da enzima manganês peroxidase na presença de diesel (consórcios 2, 5, 7 e 8), sugerindo que o poluente pode ter agido como indutor de síntese dessa

enzima. As outras enzimas ligninolíticas (lacase e lignina peroxidase) não demonstraram atividade expressiva na presença e ausência do óleo diesel.

Figura 11. Atividade enzimática (lacase, LiP e MnP) dos consórcios microbianos contendo diesel como poluente e em sua ausência.



3.3.3. Toxicidade aguda - Microtox

Os resultados de toxicidade aguda (EC_{50}), após a exposição dos experimentos contendo óleo diesel à bactéria *V. Fischeri*, para o tempo de 30 min, estão apresentados na Tabela 6. O controle (meio suplementado + diesel) foi considerado altamente tóxico, de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 3. O consórcio 3 apresentou novamente um valor maior de EC_{50} , entretanto, não houve modificação no padrão de toxicidade dos consórcios, após sete dias de experimento, ou seja, todos ainda foram considerados tóxicos, baseando-se na classificação de Bulich (1992).

Desta forma, os resultados indicam que os consórcios não foram eficientes na degradação do diesel e/ou não foram capazes de formar compostos intermediários de menor toxicidade, após sete dias de cultivo na presença do poluente. Alguns ensaios (consórcios de 4, 5, 6, 7, e 8) apresentaram toxicidade maior do que a do controle.

Tabela 6. Toxicidade aguda (EC_{50} - %) de amostras dos consórcios microbianos contendo diesel (destaque para consórcio 3).

Amostra	EC_{50} (%)
Controle	5,0
Consórcio 1	5,0
Consórcio 2	9,0
Consórcio 3	14,0
Consórcio 4	2,0
Consórcio 5	2,0
Consórcio 6	3,0
Consórcio 7	1,0
Consórcio 8	2,0

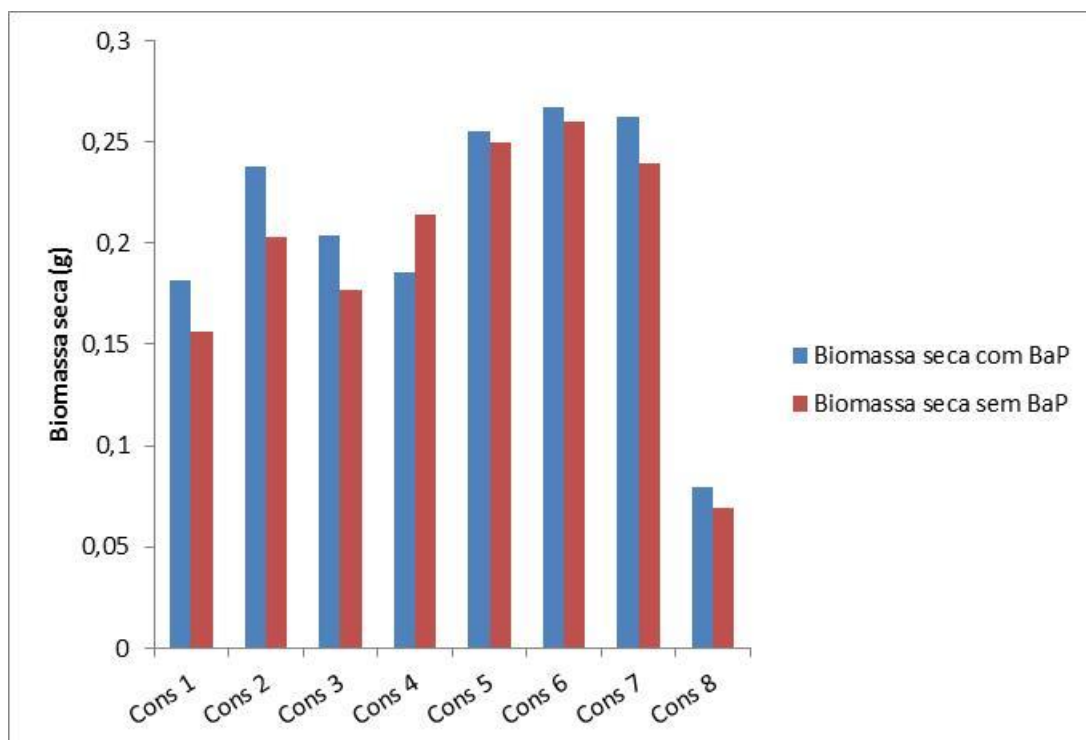
O resultado de EC_{50} do consórcio 3 pode ser indicativo de um possível início de destoxificação do poluente. Como são experimentos de sete dias, um tempo maior (14 ou 21 dias) de exposição pode ser mais eficaz na destoxificação, bem como experimentos de otimização do processo podem melhorar estes índices. De acordo com os resultados reportados por Duarte (2016), foi obtida a diminuição de 81 % na toxicidade do óleo diesel (2 %) por consórcio microbiano marinho apenas após a otimização das condições de cultivo em 21 dias de experimento.

3.4. Benzo[a]pireno - BaP

3.4.1. Biomassa seca

Os resultados das análises de biomassa seca na presença e na ausência de BaP estão apresentados na Figura 12, na qual pode ser observada uma pequena diferença entre a biomassa dos consórcios na presença e na ausência do poluente. Assim como para o RBBR, essas diferenças foram sutis e podem ter ocorrido devido aos inóculos iniciais não serem homogêneos. Todos os consórcios foram capazes de se desenvolver bem na presença e na ausência do poluente.

Figura 12. Biomassa seca dos consórcios microbianos incubados em meio líquido a 28 °C, por sete dias, na presença e ausência de BaP.

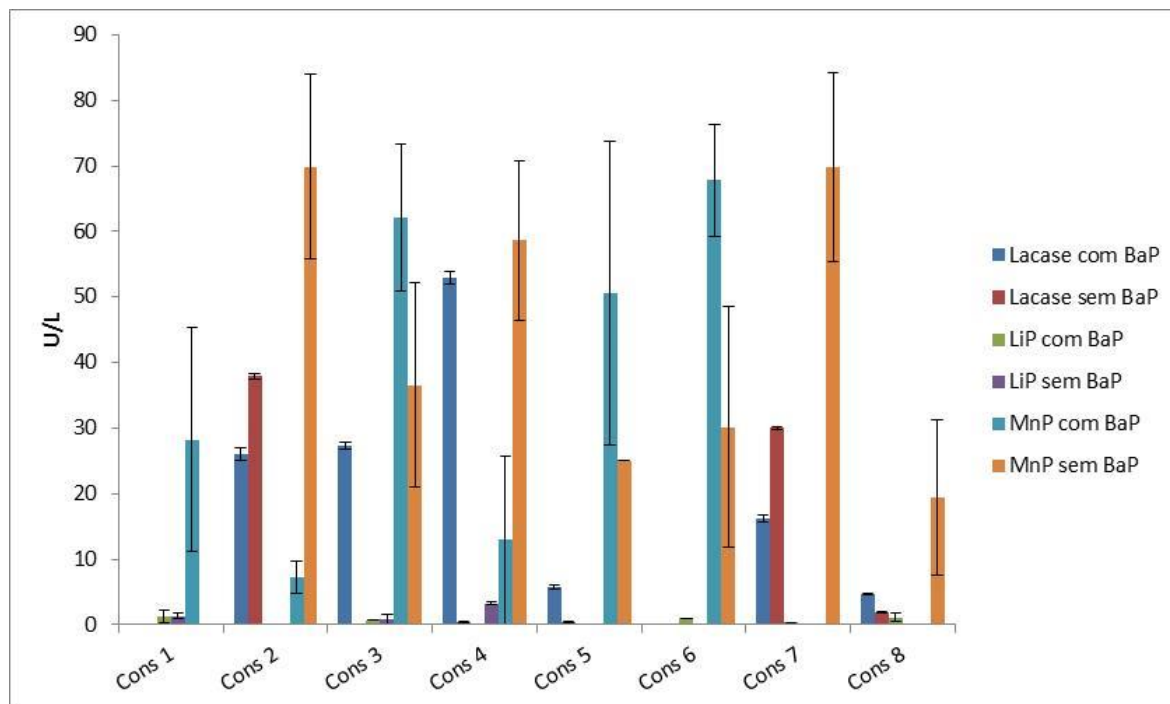


3.4.2. Atividade enzimática

Os resultados das atividades das enzimas ligninolíticas (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) estão apresentados na Figura 13 e indicam que, de maneira geral, houve uma produção mais diversificada dessas enzimas na presença de BaP.

A atividade de MnP foi mais elevada na presença do BaP para os consórcios 1, 3, 5 e 6, sugerindo uma possível relação dessa enzima com a degradação do poluente. Para os consórcios 3 e 4, foi observada uma maior produção de lacase na presença de BaP, sugerindo também a participação desta enzima na degradação do HPA. A atividade de LiP foi baixa ou ausente em todos os consórcios avaliados.

Figura 13. Atividade das enzimas ligninolíticas lacase, LiP e MnP dos consórcios contendo BaP e em sua ausência.



3.4.3. Toxicidade aguda - *Artemia* sp.

Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. foram aplicados para os consórcios contendo BaP, pois os resultados de toxicidade em Microtox foram incongruentes para este poluente, devido à não toxicidade para a bactéria *V. fischeri*. Dados da literatura indicam que o EC_{50} de BaP é de aproximadamente 8 mg/L em Microtox (EL-ALAWI et al., 2002; JACOBS et al., 1993), e a concentração utilizada no presente trabalho foi praticamente três vezes maior (20 mg/L), não condizendo com os dados de toxicidade da literatura.

Os resultados obtidos com *Artemia* sp. estão apresentados na Tabela 7, mas também apresentaram incoerência, pois o controle (meio suplementado + BaP) e os ensaios com os consórcios 4, 5, 6 e 7 contendo o poluente não apresentaram toxicidade (não houve diferença significativa, considerando $p < 0,05$, comparados ao controle). Os consórcios 1, 2, 3 e 8 demonstraram toxicidade, pois o número de indivíduos mortos diante as amostras destes consórcios foi maior do que o do controle.

Tabela 7. Análise de toxicidade em *Artemia* sp. (percentual de indivíduos vivos) dos consórcios contendo o poluente BaP e em sua ausência, além de controles.

Condições	% de indivíduos vivos	
	Com BaP	Sem BaP
Consórcio 1	46,7	67,0
Consórcio 2	23,3	70,0
Consórcio 3	16,7	60,0
Consórcio 4	73,3	96,7
Consórcio 5	80,0	100,0
Consórcio 6	80,0	83,3
Consórcio 7	63,3	83,3
Consórcio 8	3,3	10,0
Controle (Meio suplementado + 1 mg/50 mL BaP)	83,3	
Meio suplementado	93,3	

Após a obtenção destes resultados, foram avaliadas as toxicidades, utilizando *Artemia* sp., para diferentes concentrações de BaP e de pireno. O número amostral de larvas de *Artemia* sp. que antes era de 10 indivíduos por réplica do ensaio, foi elevado para 30 indivíduos, para garantir maior confiabilidade nas análises estatísticas.

Os resultados obtidos com BaP indicaram que o aumento da concentração do poluente, reduziu o número de indivíduos vivos, sugerindo toxicidade deste poluente em *Artemia* sp. (Tabela 8). Os testes estatísticos foram aplicados e apresentaram diferenças significativas entre o número de indivíduos vivos na concentração de 0,02 mg/mL e nas outras concentrações analisadas. No entanto, para o pireno, todas as concentrações propostas demonstraram grande toxicidade ao microcrustáceo, visto que a proporção de indivíduos vivos foi bastante reduzida, mesmo para a concentração de 0,04 mg/mL (Tabela 9).

Esses resultado indicaram que havia algo errado com o BaP, mesmo o composto estando dentro do prazo de validade e após a checagem com a empresa fornecedora de que não houve problemas com o lote do BaP utilizado no presente estudo. Considerando o acima exposto e os resultados coerentes de toxicidade para o pireno, utilizando *Artemia* sp. (Tabela 9), o BaP foi substituído pelo pireno (concentração de 0,04 mg/mL), para a condução dos estudos posteriores.

Tabela 8. Análise de toxicidade de diferentes concentrações de BaP em *Artemia* sp. (percentual de indivíduos vivos).

	Proporção de indivíduos vivos (%)		
	3 mg/50 mL	5 mg/50 mL	7 mg/50 mL
Meio suplementado + BaP	47,7	56,7	51,1
Meio suplementado		76,7	

Tabela 9. Análise de toxicidade de diferentes concentrações de pireno em *Artemia* sp. (percentual de indivíduos vivos).

	Proporção de indivíduos vivos (%)		
	2 mg/50 mL	4 mg/50 mL	6 mg/50 mL
Meio suplementado + Pireno	10,0	1,0	6,7
Meio suplementado		76,7	

A grande maioria dos trabalhos de descoloração/degradação de corantes têxteis não faz menção aos níveis de toxicidade após os biotratamentos. Segundo Almeida e Corso (2014), o uso do microscrustáceo *Artemia* sp. como bioindicador é fácil, econômico e rápido, além de não requerer equipamento especial. Em adição os autores relatam que a tolerância natural desse microscutáceo é uma vantagem, em relação aos bioindicadores menos adaptados a diferentes variações no ambiente abiótico. No trabalho de Almeida e Corso (2014) a toxicidade do corante *Procion Red* MX-5B foi avaliada antes e depois dos tratamentos com os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*. Os resultados revelaram que a biodegradação foi efetiva na descoloração do corante, mas gerou metabólitos tóxicos, enquanto que a biosorção foi efetiva tanto na descoloração quanto na redução da toxicidade do composto estudado.

3.5. Seleção do melhor consórcio destoxificador

Os resultados de biomassa seca na presença e na ausência dos poluentes ambientais estudados foram de maneira geral, similares ou maiores na presença dos poluentes. Estes resultados indicam que os micro-organismos dos consórcios foram ao menos tolerantes aos compostos poluentes, demonstrando que a estratégia de

utilizar micro-organismos, previamente selecionados como degradadores de hidrocarbonetos, foi eficiente.

Quanto à produção de enzimas ligninolíticas pelos consórcios na presença e na ausência dos poluentes ambientais, os resultados foram diferenciados para os três poluentes estudados. Na presença de RBBR, parece ter havido indução da lacase para todos os consórcios, visto que os mesmos apresentaram produção maior desta enzima nos experimentos contendo o corante têxtil. LiP não foi detectada e MnP foi produzida em pequenas quantidades e principalmente na ausência do RBBR. As lacases produzidas por fungos marinhos têm sido reportadas como enzimas associadas à descoloração/degradação de corantes (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012; D'SOUZA et al., 2006; RAGHUKUMAR, 2008). Para os ensaios realizados com óleo diesel, foi observado que a atividade enzimática de MnP foi mais expressiva na presença do poluente, sugerindo a participação da mesma na degradação do composto. A enzima lacase foi também produzida em quantidades menores e, principalmente, na ausência do diesel. LiP foi produzida em quantidades muito baixas em apenas dois dos consórcios estudados. A produção de enzimas ligninolíticas na presença e ausência de BaP foi mais diversificada. A enzima MnP apresentou atividades significativas e maiores na presença do poluente, para três dos consórcios estudados, enquanto a lacase foi produzida em quantidades menores na presença e na ausência do BaP. A enzima MnP foi associada à degradação de poluentes ambientais por fungos de origem marinha nos trabalhos reportados por Passarini et al. (2011) e Bonugli-Santos et al. (2012). A indução de lacase pelo RBBR e de MnP pelo óleo diesel pode estar associada com a composição química destes poluentes ambientais. Resultados similares de produção de enzimas ligninolíticas (significativas atividades de lacase e MnP e ausência ou pouca atividade de LiP) foram obtidos em outros trabalhos do grupo de pesquisa da Prof. Lara Sette (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; MAGRINI, 2012) conduzidos com fungos marinhos, corroborando os resultados encontrados no presente estudo, no qual a atividade de LiP foi ausente ou muito baixa em todos os consórcios e para todos os poluentes estudados.

Com relação à toxicidade, os resultados indicaram que o consórcio três (3) apresentou maiores valores de EC_{50} tanto para o corante têxtil RBBR quanto para o óleo diesel, nas análises realizadas em Microtox. Este consórcio é composto pelos

fungos filamentosos *Mucor racemosus* CBMAI 847 (Filo Zygomycota), *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 (Filo Basidiomycota) e pelas bactérias *Bacillus subtilis* CBMAI 707 (Filo Firmicutes) e *Dietzia maris* CBMAI 705 (Filo Actinobacteria). Esta composição em quatro diferentes Filos microbianos pode ter favorecido a capacidade do consórcio em destoxificar os poluentes ambientais. Os resultados de destoxificação de BaP utilizando *Artemia* sp. como bioindicador não foram levados em consideração, tendo em vista as incoerências encontradas nas análises para este composto. Cabe destacar que o consórcio 3 apresentou o quarto melhor resultado de descoloração do RBBR (valor real, desconsiderando a taxa de adsorção pela biomassa).

Considerando o fato de que a capacidade de destoxificação foi colocada como sendo o parâmetro principal para a seleção do melhor consórcio microbiano, desde o princípio do projeto, bem como os resultados obtidos no presente trabalho, o consórcio 3 foi selecionado como o melhor destoxificador de poluentes ambientais. Desta forma, este consórcio foi submetido aos experimentos subsequentes de avaliação de diferentes parâmetros e otimização da destoxificação de poluentes ambientais, por meio da aplicação de planejamento experimental.

Os resultados obtidos na otimização da destoxificação do óleo diesel atingiram aproximadamente 50% em sete dias de cultivo, após serem empregados três planejamentos do tipo Plackett-Burman (dados não apresentados). Porém, na validação do experimento que resultou na melhor condição de destoxificação (ensaio 10, PB3), os resultados das triplicatas foram bastante inferiores (média de 7%). Desta forma, esse poluente não foi considerado para a próxima fase do trabalho. Em adição, em um outro estudo do grupo de pesquisa da Prof. Lara Sette, o consórcio de micro-organismos marinhos constituído por *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Cryptococcus laurentii* CRM 707 apresentou cerca de 80 % de destoxificação do óleo diesel (2 %), após 21 dias de cultivo (DUARTE, 2016) em meio de cultura relativamente simples (extrato de malte como única fonte de carbono).

Os estudos de otimização da destoxificação do pireno (substituto do BaP) foram conduzidos no Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Carla de Rezende Leme (Engenharia Ambiental, UNESP/Rio Claro) intitulado “Aplicação de consórcio microbiano marinho na destoxificação do pireno”, o qual foi desenvolvido em

associação com o presente trabalho. Na otimização do processo foi conduzido um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman e um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). O ensaio 17 do PB apresentou melhores resultados de destoxificação e, na validação, a taxa de sobrevivência média das *Artemias* sp. nas quadruplicatas dos ensaios, após sete dias de cultivo, foi de 58,53 % (LEME, 2016). Experimentos adicionais foram realizados utilizando as condições do ensaio 17, porém com algumas modificações (quantidade de inóculo bacteriano passou a ser 4 mL e o poluente foi colocado primeiramente em contato com a solução de bactérias). Os resultados obtidos com o experimento 17 modificado, o qual continha 4 cilindros de 0,5 cm de cada fungo e 4 mL de cada bactéria, 1 g/50 mL de extrato de malte, 0,73 mM/50 mL de fosfato de sódio monobásico (KH_2PO_4), 0,46 mM/50 mL de riboflavina, 100 % (v/v) de água do mar artificial em pH 8, revelaram que as modificações realizadas produziram um aumento de 10 % na taxa de sobrevivência das artêmias (68,53 %). Esses resultados indicam que as bactérias provocaram transformações iniciais no pireno que facilitaram uma posterior degradação/destoxificação pelos fungos filamentosos. Desta forma, ficou evidenciada a importância tanto das bactérias quanto dos fungos filamentosos do consórcio 3 no processo de destoxificação do pireno, visto que no experimento controle, no qual havia apenas as bactérias, o resultado de destoxificação foi de 41,12 % (LEME, 2016).

O presente trabalho levou adiante os estudos de otimização da destoxificação e descoloração do corante têxtil RBBR. Este foi o poluente com melhores resultados de destoxificação entre os três compostos estudados e com resultados de descoloração de 35% pelo consórcio 3.

No capítulo II estão apresentados e discutidos os resultados da avaliação de diferentes fatores na destoxificação e descoloração do RBBR, visando otimização do processo.

CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL RBBR POR CONSÓRCIO MICROBIANO MARINHO, UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

1. INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de corantes são produzidas e utilizadas na indústria têxtil, cosmética, de papel, couro, farmacêutica, de alimentos, entre outras (GÖNEN; AKSU, 2009). Muitas vezes, os resíduos provenientes de tais indústrias são descartados no ambiente, antes de um pré-tratamento para remoção da cor e da toxicidade. Nesse contexto, é crescente a aplicação de processos biológicos que utilizam micro-organismos para remover contaminantes ambientais. Porém, é necessária a aplicação de métodos de otimização desses processos, pois os mesmos envolvem a interação de diversas variáveis (GÖNEN; AKSU, 2009).

O planejamento experimental implica em grande economia de tempo e custos, devido à diminuição considerável do número de ensaios necessários ao estudo de um processo influenciado por diversas variáveis (DENIZ, 2014), como o caso da destoxificação, descoloração e/ou degradação de poluentes ambientais por micro-organismos. Vários estudos reportados em literatura utilizam este método (RODRIGUES; IEMMA, 2009). No presente capítulo, o consórcio 3 (constituído pelos fungos de origem marinha *Mucor racemosus* CBMAI 847 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 e pelas bactérias isoladas de petróleo *Bacillus subtilis* CBMAI 707 e *Dietzia maris* CBMAI 705) foi utilizado nos experimentos de verificação da influência de diferentes variáveis e otimização da destoxificação do corante têxtil RBBR, por planejamento experimental. Neste estudo foram aplicados indutores de produção enzimática e diferentes fontes de carbono e nitrogênio, para favorecimento da destoxificação/descoloração do poluente.

A melhor condição obtida entre os planejamentos experimentais foi validada e os experimentos complementares foram executados: análises de adsorção do corante pela biomassa, biomassa seca, atividade de enzimas ligninolíticas, bem como análise qualitativa de degradação do corante RBBR, pela técnica de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Planejamento experimental

Neste estudo, foi utilizado o planejamento experimental para investigar o efeito das condições de cultivo sobre o processo de destoxificação e descoloração do corante RBBR, bem como obter as condições necessárias para essa finalidade (condição otimizada). Foram empregados dois planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB) (PLACKETT; BURMAN, 1946) e um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional).

A capacidade de destoxificação de todos os ensaios dos planejamentos e do DCCR foi avaliada utilizando a *Artemia* sp. como bioindicador, de acordo com o método descrito no item 2.6.2. (Capítulo I), porém com um número de 30 indivíduos e 5 mL de amostra. A descoloração do poluente foi determinada para todos os ensaios em UV/Vis espectrofotômetro, de acordo com o item 2.8. (Capítulo I), sendo o controle constituído de água deionizada + corante (nas concentrações empregadas no PB1) e ASW + corante para o PB2 e o DCCR. Os ensaios dos planejamentos experimentais não contêm réplicas, exceto os pontos centrais, que foram avaliados em quadruplicata.

A avaliação do efeito das diferentes variáveis independentes empregadas nos planejamentos experimentais Plackett-Burman, assim como no DCCR frente à destoxificação e descoloração (variáveis dependentes) do corante RBBR foi realizada utilizando o programa STATISTICA 8.0 (STATSOFT, INC. 2007), sendo empregado $p\text{-valor} < 0,1$.

2.1.1. 1º Planejamento Plackett-Burman (PB1)

Inicialmente, 13 variáveis independentes foram avaliadas no primeiro planejamento experimental Plackett-Burman (PB1), utilizando a matriz PB20 (ANEXO 1), totalizando 24 ensaios (incluindo quatro pontos centrais). As variáveis independentes e as suas respectivas concentrações estão apresentadas na Tabela 10. Essas variáveis foram definidas de acordo com os resultados de destoxificação e descoloração obtidos no presente trabalho, bem como em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, previamente realizado para a degradação de RBBR por fungo de origem marinha (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012). Todas as diferentes variáveis foram apresentadas em dois níveis, designados como -1 para o

inferior e +1 para o superior (Tabela 10), de acordo com a matriz PB20 codificada (ANEXO 1). Para a determinação do erro experimental, foram adicionados à matriz quatro ensaios no ponto central. Para a obtenção do inóculo bacteriano, foi considerada a DO de 0,4 em 600 nm (lida em UV/Vis espectrofotômetro) e para o inóculo fúngico cilindros de ágar + micélio, conforme descrito no item 2.4 (Capítulo I). A salinidade está representada pela porcentagem de água do mar artificial (ASW) utilizada nos ensaios, sendo 100 % de ASW representada por 3,5 % de salinidade e 50 % de ASW por 1,75 % de salinidade. A composição da ASW está descrita no item 2.6.2. (Capítulo I).

Tabela 10. Níveis das variáveis estudadas no 1º planejamento experimental Plackett-Burman para o corante RBBR.

Variável	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
1. Inóculo fúngico (cilindros de 0,5 cm)	2	3	4
2. Inóculo bacteriano (mL/50mL)	1	2	3
3. Glicose (g/50mL)	0	0,5	1
4. Extrato de levedura (g/50mL)	0	0,25	0,5
5. Peptona (g/50mL)	0	0,05	0,1
6. Extrato de malte (g/50mL)	0	0,5	1
7. Farelo de trigo (g/50mL)	0	0,25	0,5
8. Serragem (g/50mL)	0	0,25	0,5
9. CuSO ₄ (mM/50mL)	0	2	4
10. Guaiacol (mM/50mL)	0	1	2
11. Corante (ppm/50mL)	250	500	750
12. pH	6	7	8
13. Salinidade (ASW%)	0	50	100

2.1.2. 2º Planejamento Plackett-Burman (PB2)

O segundo planejamento do tipo Plackett-Burman (PB2) empregado avaliou a influência de nove variáveis independentes sobre o processo de destoxificação e

descoloração do corante RBBR. Para tanto, foi utilizada uma matriz PB 16 (ANEXO 2), totalizando 20 ensaios (incluindo quatro pontos centrais). Na Tabela 11 estão apresentadas as variáveis utilizadas no PB2 e suas respectivas concentrações/quantidades. Ao longo das análises dos planejamentos experimentais, algumas variáveis foram eliminadas do processo ou foram fixadas em uma devida concentração.

Tabela 11. Níveis das variáveis estudadas no 2º planejamento Plackett-Burman para o corante RBBR

Váriável	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
	-1	0	+1
1. Inóculo fúngico (cilindros 0,5 cm)	2	3	4
2. Inóculo bacteriano (mL/50mL)	2	3	4
3. Extrato de levedura (g/50mL)	0	0,5	1
4. Peptona (g/50mL)	0	0,1	0,2
5. Extrato de malte (g/50mL)	0	1	2
6. Farelo de trigo (g/50mL)	0	0,5	1
7. Guaiacol (mM/50mL)	0	2	4
8. Corante (ppm/50mL)	500	750	1000
9. pH	6	7	8

2.1.3. DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)

Como última estratégia no processo de otimização das condições de cultivo, para elevar a destoxificação e descoloração do corante RBBR, foi empregado um DCCR. Para tanto, foram consideradas somente duas variáveis: farelo de trigo e concentração do corante. O DCCR foi composto pelos níveis inferior e superior, o ponto central, bem como os pontos axiais (matriz disponível no ANEXO 3), os quais estão apresentados na Tabela 12, com suas respectivas concentrações para as variáveis analisadas.

Tabela 12. Níveis das variáveis estudadas no DCCR para o corante RBBR.

Variável	Ponto axial inferior -1,41	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1	Ponto axial superior +1,41
1. Farelo de trigo (g/50mL)	0,59	1	2	3	3,41
2. Corante (ppm/50mL)	397,5	500	750	1000	1102,5

2.2. Validação experimental

A validação experimental consistiu em repetir o ensaio que apresentou a melhor condição de destoxificação e descoloração para o corante RBBR ao longo dos planejamentos realizados no intuito de confirmação da resposta obtida. Além dos bioensaios, foram analisados controles constituídos por meio de cultivo otimizado, com e sem o corante RBBR, e por meio de cultivo otimizado com os micro-organismos do consórcio. Todas as condições (bioensaio e controles) foram realizadas em quadruplicata. Os experimentos da validação foram cultivados por sete dias a 28 °C e 140 rpm. A biomassa seca dos experimentos de validação foi determinada conforme descrito no item 2.5 (Capítulo I), porém a biomassa foi seca por 48h a 105 °C. O caldo enzimático resultante dos experimentos de validação foi avaliado quanto à descoloração e adsorção pela biomassa, de acordo com os itens 2.8 e 2.9, respectivamente (Capítulo I) e a atividade enzimática de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) foi quantificada, segundo os protocolos descritos no item 2.7 (Capítulo I).

2.2.1. FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Análises de FTIR (Shimadzu FTIR-8300) foram realizadas para se obter, qualitativamente, informações sobre a possível degradação do corante RBBR, após o processo de biodegradação pelo consórcio microbiano. Este método é uma ferramenta útil para analisar os metabólitos formados nos processos de biodegradação de corantes (ALMEIDA; CORSO, 2014). Assim, para as análises de FTIR, as amostras foram concentradas com auxílio de um concentrador de amostras

e secas em dessecador. KBr foi macerado em contato com a amostra em uma proporção de 10 mg da amostra: 200 mg de KBr. Essa mistura foi compactada em discos e as análises foram executadas em região média de infravermelho (400–4000 cm^{-1}), com 32 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. 1º Planejamento experimental (PB1)

Os resultados do primeiro planejamento Plackett-Burman (PB1) estão apresentados na Tabela 13. Os percentuais de destoxificação e descoloração variaram de 0 a 98 % e 26 a 85 %, respectivamente. Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de descoloração do RBBR para todos os ensaios do PB1, sendo as curvas agrupadas conforme a concentração de corante empregada no ensaio do planejamento, tendo sido os percentuais de descoloração calculados a partir do controle (água deionizada + corante).

Em uma análise combinada, o ensaio 11 foi o que apresentou melhores resultados de destoxificação e descoloração do corante RBBR pelo consórcio microbiano, atingindo 94 % e 82 %, respectivamente. Esse ensaio continha o máximo da concentração do corante (750 ppm) empregada no PB1, demonstrando o elevado potencial do consórcio no biotratamento deste corante.

Tabela 13. Resultados de destoxificação e descoloração dos ensaios do PB1. Destaque para os resultados de destoxificação e descoloração obtidos no ensaio 11.

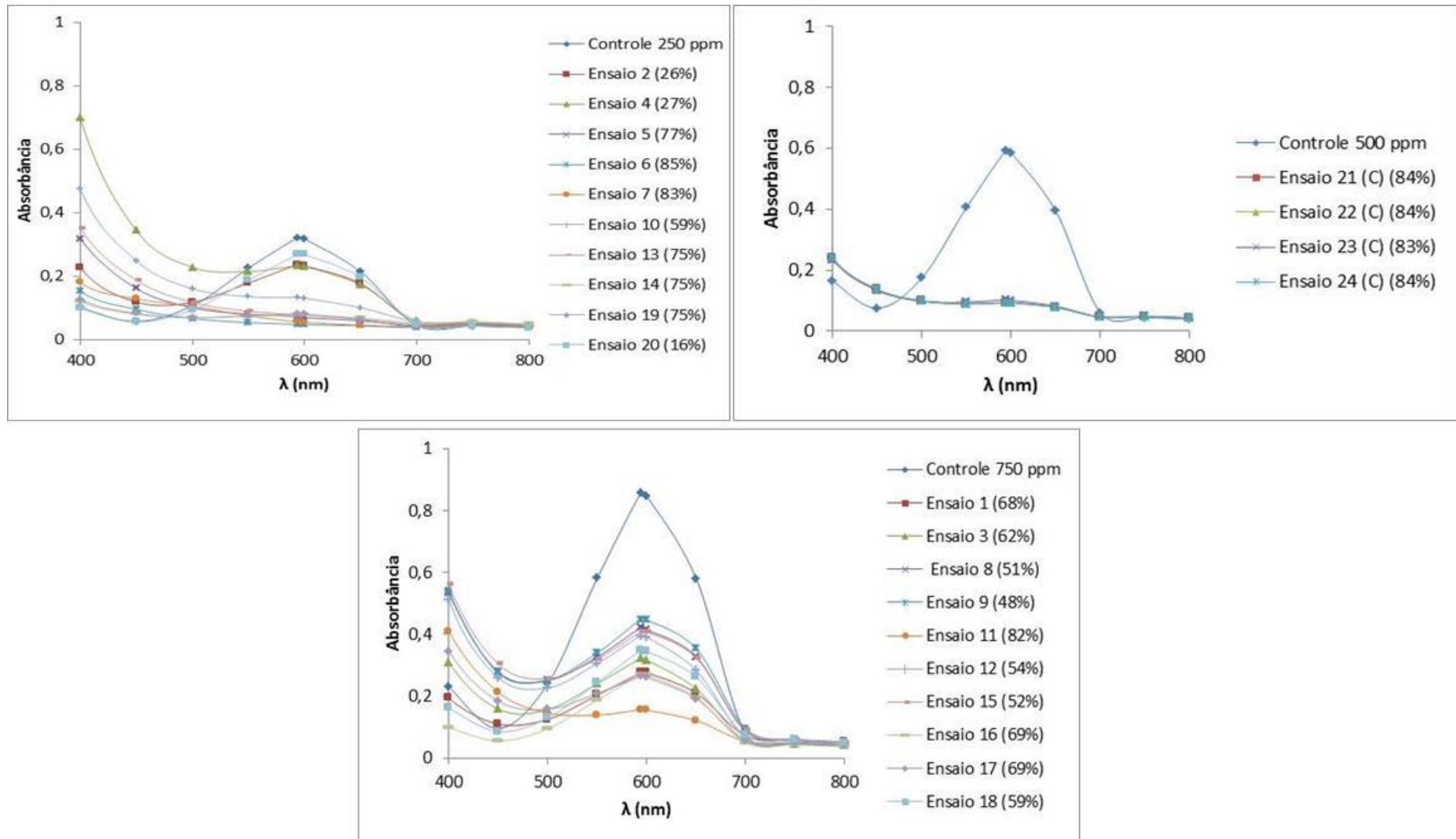
Ensaio	PB1	
	Destoxificação (% sobreviventes)	Descoloração (%)
1	0	68
2	0	26
3	28	62
4	10	27
5	89	77
6	0	85 ^b
7	0	83 ^b
8	0	51
9	24	48
10	98 ^a	59
11	94 ^a	82 ^b
12	3	54
13	91	75
14	0	75
15	0	52
16	13	69
17	6	69
18	9	59
19	0	75
20	96 ^a	16
21 ^c	53	84 ^b
22 ^c	33	84 ^b
23 ^c	46	83 ^b
24 ^c	20	84 ^b

a = melhores valores de destoxificação;

b = melhores valores de descoloração;

c = pontos centrais

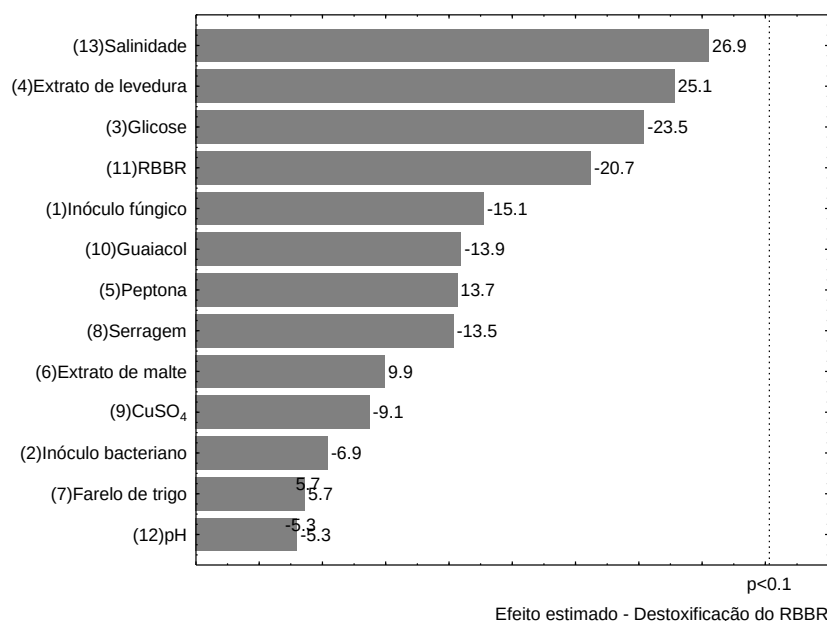
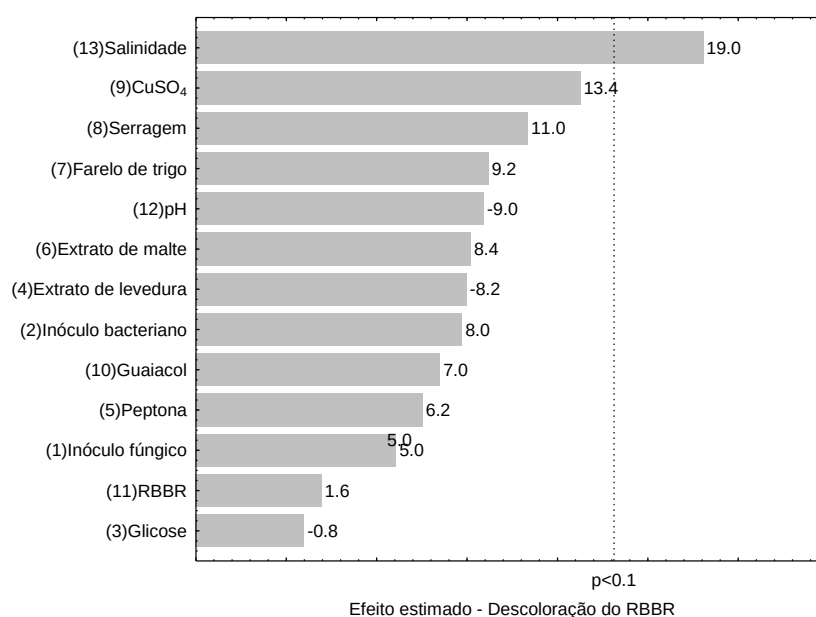
Figura 14. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no PB1. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.



Os resultados das análises estatísticas da destoxificação e descoloração, apresentados nas Figuras 15 e 16, foram obtidos com o auxílio do programa STATISTICA 8.0 (STATSOFT, INC. 2007). Esses resultados, juntamente com a análise das condições de cultivo do ensaio que apresentou o melhor resultado de destoxificação e descoloração (Tabela 13), foram a base para a estruturação do segundo planejamento Plackett-Burman (PB2).

Nenhuma variável apresentou efeito significativo para a destoxificação do poluente (Figura 15). No entanto, a salinidade apresentou efeito positivo, elevado para a destoxificação, e efeito positivo, estatisticamente significativo, para a descoloração (Figura 16). Em adição, no ensaio 11 esta variável estava em seu maior nível (100 % de ASW), representando 3,5 % de salinidade. Desta forma, a variável salinidade foi fixada para o próximo planejamento em 100 % v/v, ou seja, o volume total do ensaio (50 mL).

A glicose apresentou efeito negativo e não significativo para ambas as respostas e não estava presente no ensaio 11. Sendo assim, foi eliminada do planejamento posterior, pois é um componente de alto custo para um processo biotecnológico. Serragem e CuSO_4 apresentaram efeito negativo para destoxificação, mas demonstraram efeito positivo na descoloração do poluente. Como essas duas variáveis estavam ausentes no ensaio 11, elas foram eliminadas da etapa seguinte do experimento (PB2).

Figura 15. Efeito das 13 variáveis estudadas no PB1 na destoxificação do RBBR.**Figura 16.** Efeito das 13 variáveis estudadas no PB1 na descoloração do RBBR.

Com exceção do inóculo fúngico e pH, as demais variáveis mesmo não demonstrando efeito significativo, estavam presentes em maior nível no ensaio 11. Sendo assim, para o PB2, elas tiveram suas concentrações elevadas nos pontos centrais e no nível superior +1 (Tabela 11).

3.2. 2º Planejamento Experimental (PB2)

Os resultados de destoxificação e descoloração do corante RBBR dos ensaios do PB2 demonstraram uma variação na destoxificação entre 0 e 99 % e na descoloração entre 32 a 86 % (Tabela 14). As curvas de descoloração do corante RBBR estão apresentadas na Figura 17. Neste planejamento, foi eliminado da análise estatística um ensaio do ponto central, por este apresentar resultado incongruente.

O ensaio 2 mostrou melhores resultados de destoxificação (91 %) e de descoloração (86 %). Esses resultados foram bastante próximos aos obtidos no ensaio 11 do PB1. Cabe ressaltar que, embora a concentração do corante empregada nesse ensaio fosse de 500 ppm, menor do que a presente no ensaio 11 do PB1 (750 ppm), o meio de cultivo do ensaio 2 contém menos variáveis: somente inóculos fúngico (4 cilindros de cada fungo do consórcio) e bacteriano (4 mL de cada bactéria do consórcio), farelo de trigo (1 g/50mL), 100 % (v/v) de ASW em pH 8,0.

Tabela 14. Resultados de destoxificação e descoloração dos ensaios do PB2. Destaque para os resultados de destoxificação e descoloração obtidos no ensaio 2.

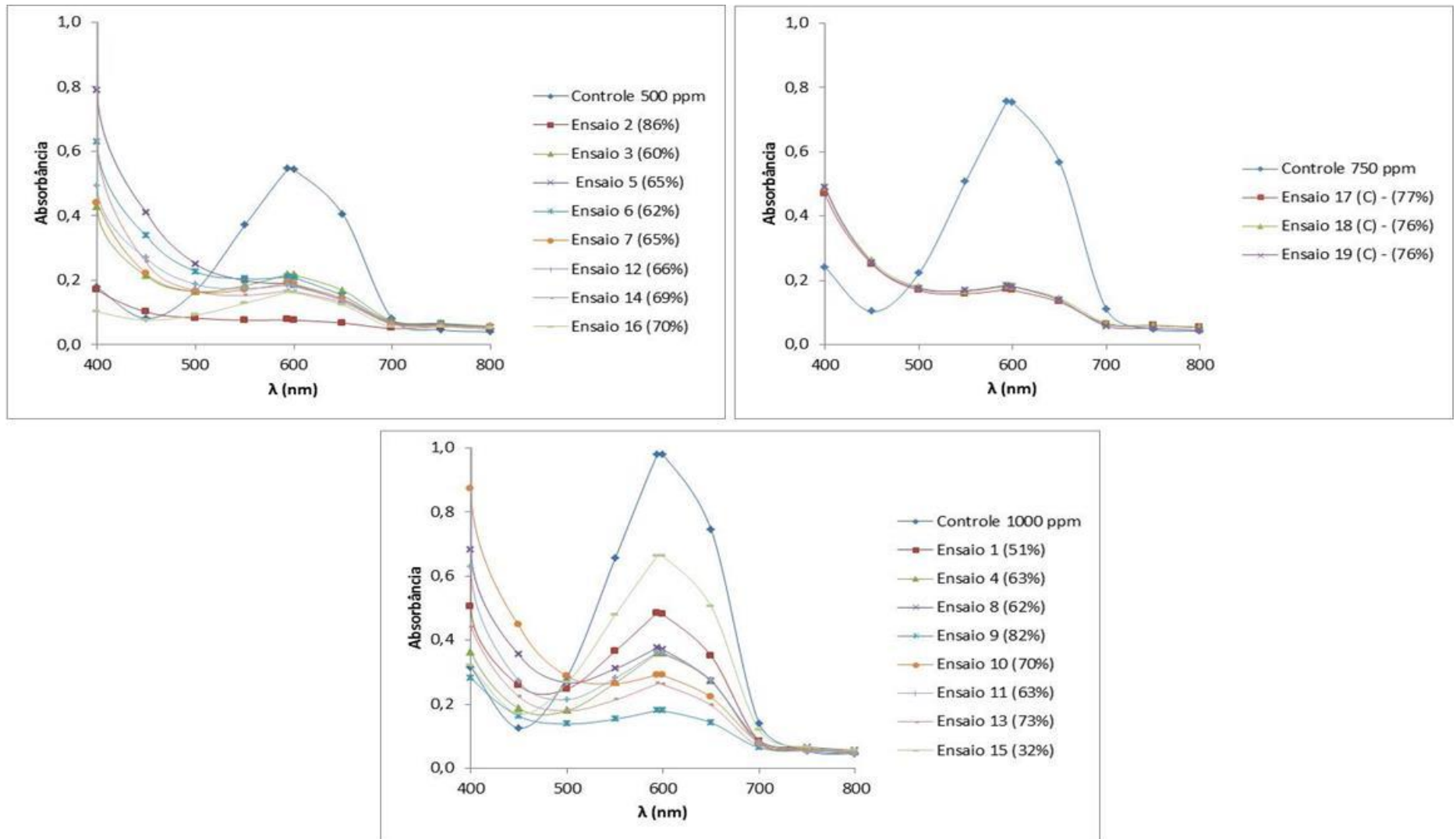
Ensaio	PB2	
	Destoxificação (% sobreviventes)	Descoloração (%)
1	96 ^a	51
2	91 ^a	86 ^b
3	0	60
4	0	63
5	0	65
6	46	62
7	38	65
8	20	62
9	25	82 ^b
10	0	70
11	0	63
12	65	66
13	36	73
14	0	69
15	17	32
16	99 ^a	70
17 ^c	14	77
18 ^c	24	76
19 ^c	30	76

a = melhores valores de destoxificação;

b = melhores valores de descoloração;

c = pontos centrais.

Figura 17. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no PB2. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.



Os resultados dos efeitos das nove variáveis sobre as respostas destoxificação e descoloração do PB2, apresentados nas Figuras 18 e 19, revelaram que o extrato de levedura apresentou efeito negativo e significativo na destoxificação do poluente, assim como o guaiacol, o inóculo bacteriano, a peptona e a concentração do corante RBBR. Por outro lado, o inóculo fúngico apresentou efeito positivo e significativo. Para a descoloração do poluente (Figura 19), somente o inóculo bacteriano e o farelo de trigo demonstraram efeito significativo e positivo.

A condição de cultivo do ensaio 2 continha, além dos inóculos dos micro-organismos, farelo de trigo, 100 % de ASW e pH 8,0. Desta forma, foi fixado para a próxima etapa, ensaios utilizando a estratégia de DCCR, onde o inóculo fúngico foi usado em maior quantidade (4 cilindros de 0,5 cm de cada fungo do consórcio), assim como o inóculo bacteriano (fixado em 4 mL de cada bactéria). O pH foi fixado em 8,0. O farelo de trigo, estava presente em sua maior concentração (1 g/50mL) no ensaio 2 e foi a primeira variável selecionada para o DCCR. A concentração do corante RBBR foi a segunda variável contemplada para o DCCR. Mesmo com efeito negativo para ambas as respostas no PB2, os resultados do PB1 evidenciaram o potencial de destoxificação/descoloração de concentrações mais elevadas do corante. No ensaio 11 (PB1), aquele com melhores resultados de destoxificação e descoloração do corante, a concentração do poluente era de 750 ppm.

Figura 18. Efeito das nove variáveis na destoxificação do RBBR obtidos no PB2.

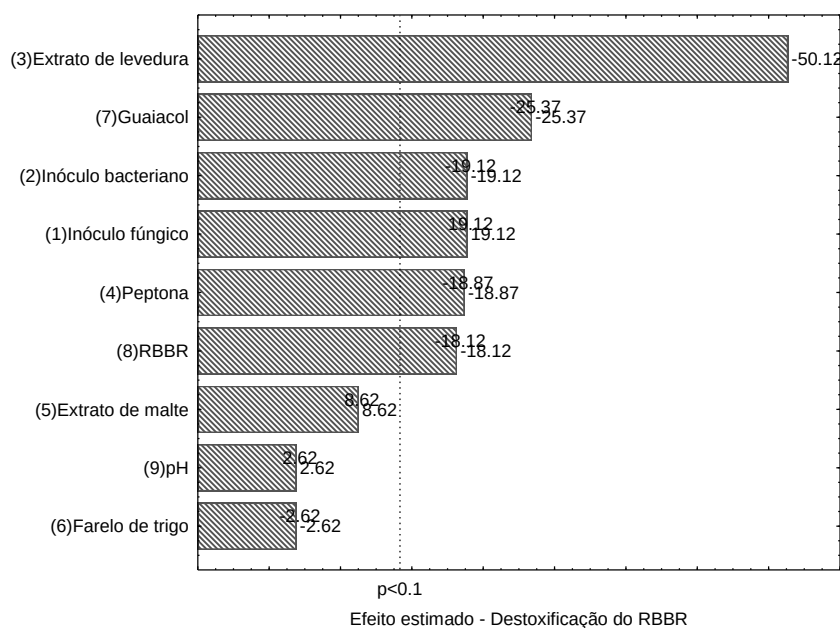
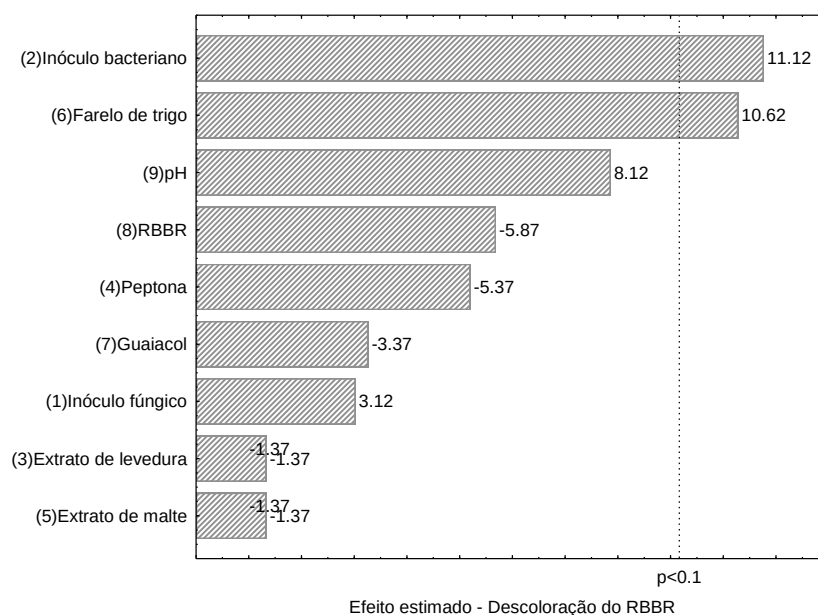


Figura 19. Efeito das nove variáveis na descoloração do RBBR obtidos no PB2.

3.3. DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)

Os resultados obtidos no DCCR estão apresentados na Tabela 15 e para a destoxificação não foram tão efetivos quanto os planejamentos anteriores, variando de 18 a 68 % de larvas de *Artemia* sp. sobreviventes. Para a descoloração, os resultados variaram de 85 a 92 %, acima daqueles percentuais encontrados para os PB1 e PB2. As curvas de descoloração do RBBR estão apresentadas na Figura 20.

O ensaio 1 foi o que apresentou o melhor resultado de destoxificação. Nas condições do ensaio 1, a descoloração foi de 89 %. O ensaio 1 continha as mesmas condições do ensaio 2 do PB2: 1 g/50mL de farelo de trigo e 500 ppm de corante RBBR. Porém, como o percentual de destoxificação foi abaixo do apresentado no ensaio dois do PB2 (91 %) e o percentual de descoloração bastante próximo (86 %), concluímos que o DCCR não foi eficaz para a destoxificação do poluente. É importante salientar que em um processo que envolve descoloração de corante, a ausência de cor não é diretamente proporcional à ausência de toxicidade, já que intermediários de processos de biodegradação deste poluente podem apresentar toxicidade mais elevada que o composto original (ALMEIDA; CORSO, 2014).

Figura 20. Curvas de descoloração do RBBR obtidas no DCCR. Os ensaios estão agrupados conforme a concentração do corante empregada.

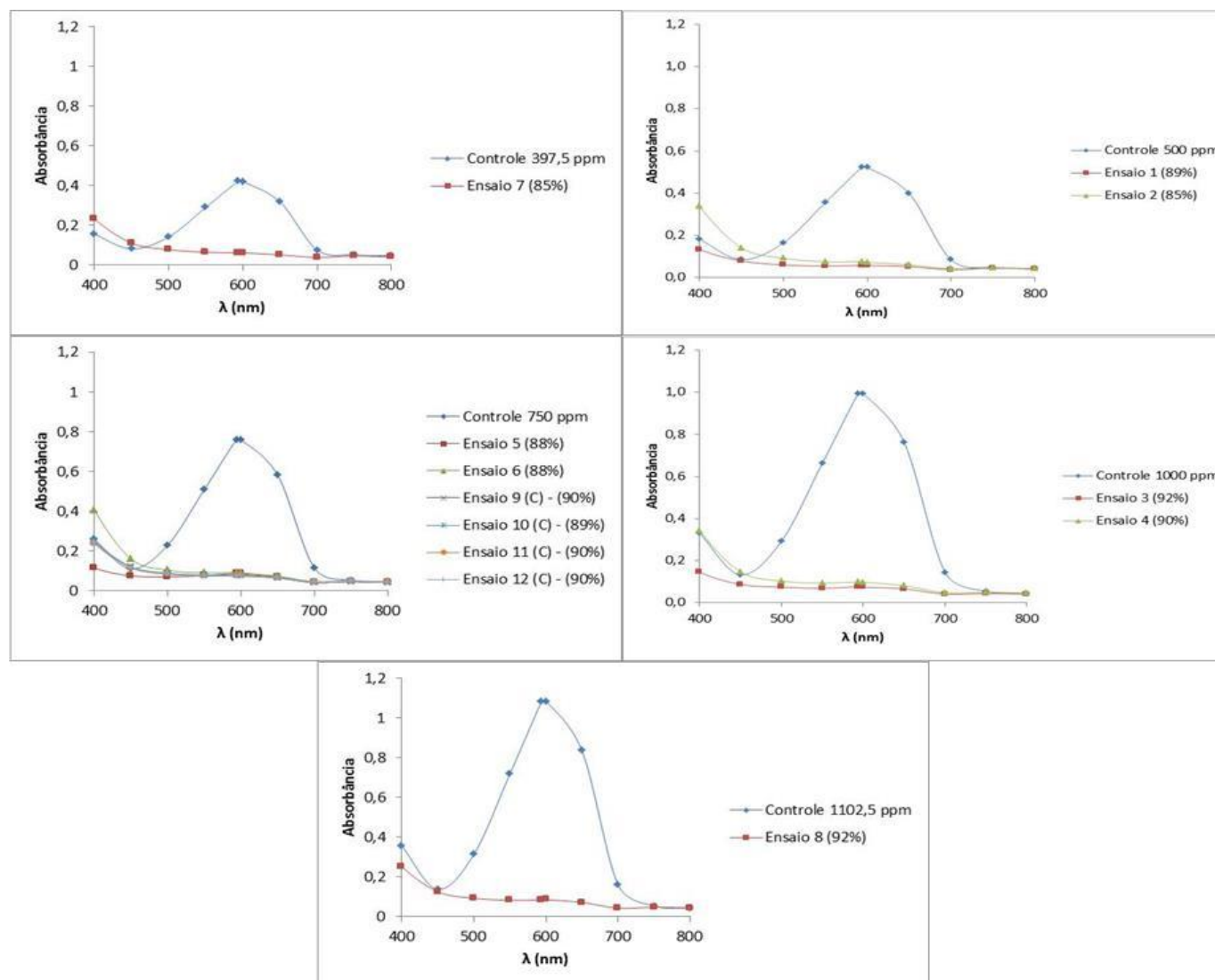


Tabela 15. Resultados dos ensaios do DCCR.

Ensaio	DCCR	
	Destoxificação (% sobreviventes)	Descoloração (%)
1	68^a	89^b
2	41	85
3	53 ^a	92 ^b
4	39	90 ^b
5	36	88
6	24	88
7	38	85
8	18	92 ^b
9^c	26	90 ^b
10^c	38	89 ^b
11^c	40	90 ^b
12^c	42	90 ^b

a = melhores valores de destoxificação;

b = melhores valores de descoloração;

c = pontos centrais.

As variáveis empregadas no DCCR não foram estatisticamente significativas, apresentando $p > 0,1$, conforme pode ser observado nas Figuras 21 e 22, tanto para destoxificação quanto para descoloração do corante RBBR. Quando há dados estatísticos significativos do DCCR (quadrático – Q e linear – L), os mesmos podem ser empregados para a elaboração de um modelo matemático preditivo, que representa a obtenção das respostas desejadas.

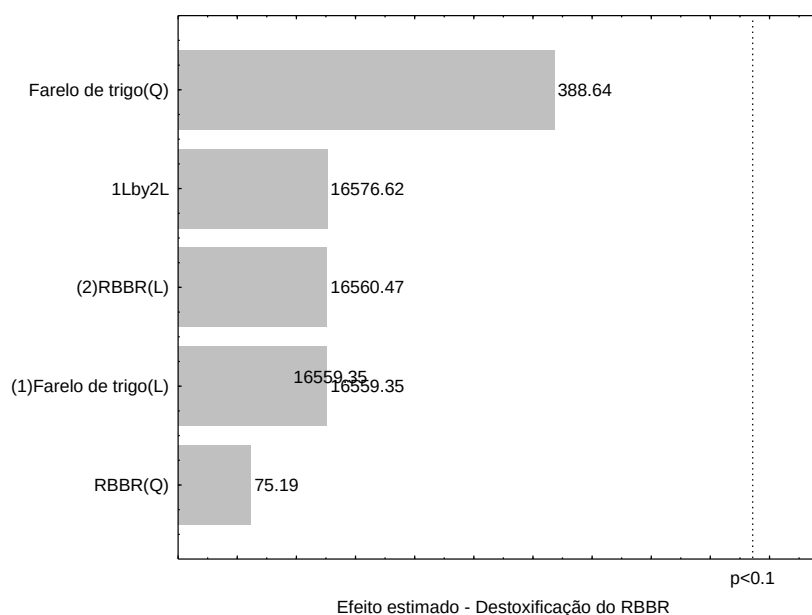
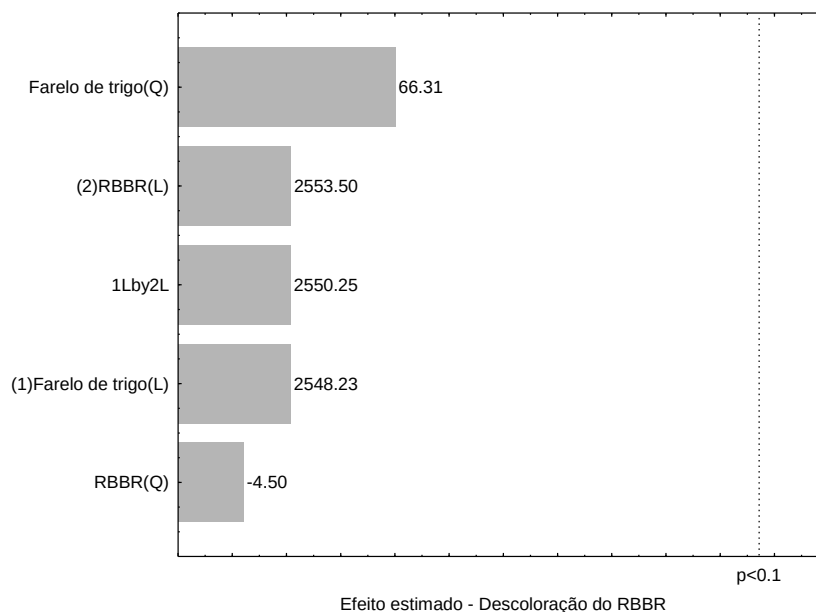
Figura 21. Efeito das duas variáveis na destoxificação do RBBR obtidos no DCCR.

Figura 22. Efeito das duas variáveis na descoloração do RBBR obtidos no DCCR.



Os resultados obtidos neste trabalho para a estratégia do DCCR não permitiram elaborar um modelo matemático capaz de prever a destoxificação e descoloração do corante. Em um recente trabalho de Bonugli-Santos et al. (2016), foi utilizada a estratégia de desenho experimental, composta por dois planejamentos do tipo Plackett-Burman (PB 16 e PB12) e dois DCCR, na otimização da descoloração do corante Preto Reativo 5 (200 mg/L) pelo fungo derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Os autores ressaltaram que tal ferramenta estatística foi empregada com sucesso e possibilitou atingir elevado percentual de descoloração (de 70 % para mais de 90 %) e degradação (98 %) do corante em sete dias e em condições salinas, evidenciando ser este um método atrativo para seleção e otimização de variáveis envolvidas no processo degradativo. Os autores observaram ainda que não houve formação de compostos mutagênicos (avaliado pelo teste de AMES), após o processo biodegradativo. No presente estudo, o planejamento experimental possibilitou elevar a descoloração do corante RBBR pelo consórcio 3 de 35 % (Capítulo I) para 89 % (DCCR).

No estudo conduzido por Shuib et al. (2016) foi avaliada a descoloração do corante RBBR pelo fungo basidiomiceto *Marasmius cladophyllus* UMAS MS8 (pertencente à mesma família do gênero *Marasmiellus*) por 15 dias em solo suplementado com casca de arroz, para favorecer a biomassa fúngica, por meio de planejamento experimental do tipo Plackett-Burman. Os autores reportaram que

dentre as 11 variáveis que poderiam afetar o processo de descoloração do corante, quatro fatores foram mais efetivos neste processo (concentração do corante, extrato de levedura, tempo de incubação e tamanho do inóculo), porém somente três variáveis foram selecionadas para estudos adicionais. Foi observada a remoção de 91 % do corante RBBR (200 ppm), após 15 dias de experimento, valores de descoloração semelhantes aos obtidos no presente trabalho, porém com 500 ppm e sete dias de cultivo. Os autores salientaram que o planejamento do tipo Plackett-Burman foi um método rápido e eficiente para a seleção de fatores com um número mínimo de experimentos.

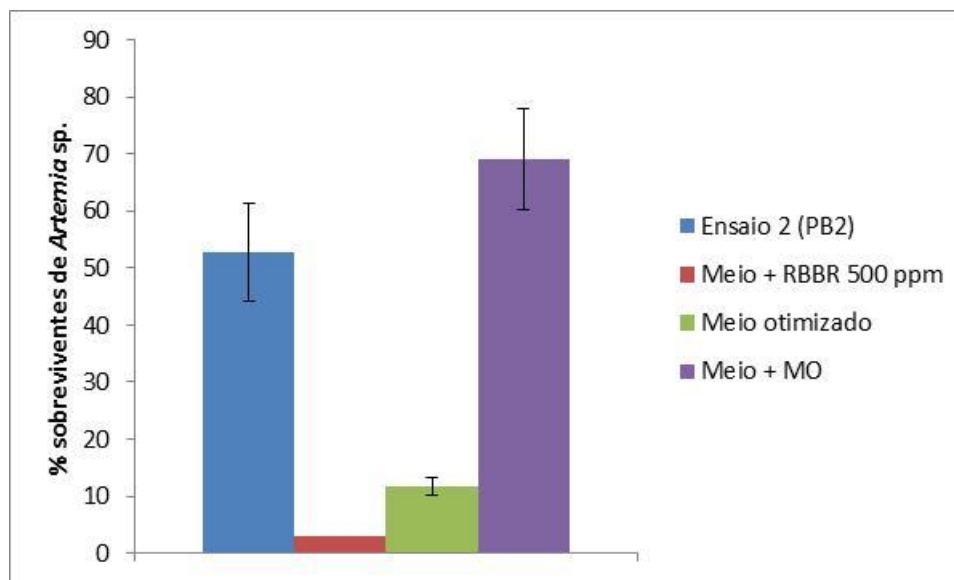
3.4. Validação experimental

A validação experimental consistiu em repetir as condições dos ensaios que apresentaram melhores resultados nos planejamentos experimentais, quanto à destoxificação e descoloração do corante têxtil RBBR: ensaio 11 do PB1 e ensaio dois do PB2. Controles contendo somente o meio otimizado, meio + corante e meio + micro-organismos também foram analisados. Todos os experimentos da validação foram feitos em quadruplicata.

Os resultados de destoxificação obtidos na validação do ensaio 11 (PB1) foram inferiores (média de 14 %) aos obtidos durante o planejamento experimental (94 %). Medidas de descoloração do corante não foram realizadas, devido este baixo percentual de destoxificação. Como os resultados da validação da destoxificação do corante foram bastante aquém daqueles obtidos no ensaio 11 (PB1), não foi possível afirmar que tal condição foi validada.

Os resultados de destoxificação de todas as condições avaliadas (ensaio e controles) no experimento de validação do ensaio 2 (PB2) estão apresentados na Figura 23. No PB2, o ensaio 2 apresentou 91 % de destoxificação e 86 % de descoloração, porém, na validação o valor de destoxificação não foi reproduzido. A média da destoxificação nas réplicas da validação foi de 52 %. A não reprodutibilidade dos resultados pode estar relacionada ao inóculo inicial dos micro-organismos que compõem o consórcio microbiano.

Figura 23. Validação experimental do ensaio 2 do PB2 quanto à destoxificação.



No experimento de validação do ensaio 2 (PB2), foi verificado um baixo percentual de sobreviventes de larvas de *Artemia* sp., quando somente o meio otimizado foi avaliado, sugerindo que o meio de cultura apresenta toxicidade para o bioindicador utilizado (*Artemia* sp.). Tal fato pode estar associado à baixa de pH (5,9) que o meio sofreu após autoclavação e o tempo de sete dias de experimento, durante o qual o farelo de trigo libera um tipo de amido que, possivelmente, ocasiona alteração do pH. De acordo com Doyle e McMahon (1995), o pH ideal para a sobrevivência de larvas de *Artemia franciscana* é de 7,3 a 8,2. Assim, o valor mais baixo de pH do meio otimizado pode ter interferido na sobrevivência do microcrustáceo. Tal padrão de toxicidade também foi observado quando o meio + RBBR foi avaliado. Neste caso, embora o pH medido também fosse próximo de 6,0, indicando que parte dessa toxicidade pode ser do próprio meio otimizado, não podemos descartar a toxicidade do corante em si, já que o nível de sobrevivência de *Artemia* sp., para esta condição, foi ainda mais baixo. O pH dos bioensaios e do meio + micro-organismos, após os sete dias de cultivo, estava em torno de 8,0, descartando a influência dessa variável na destoxificação do poluente (morte de artêmias).

Apesar da constatação visual de crescimento micelial fúngico nos bioensaios, o pH 8,0 pode ter favorecido o desenvolvimento das bactérias do consórcio, tendo em vista a preferência das mesmas por valores de pH mais próximos do neutro e

dos fungos por valores de pH mais baixos. De acordo com Moreira Neto, Matheus e Machado (2009), o pH do meio de cultura influenciou o crescimento de fungos basidiomicetos ligninolíticos, durante a descoloração do RBBR. Segundo os autores, os fungos *Lentinus crinitus* e *Psilocybe castanella* apresentaram menor crescimento em pH 5,9 e 2,7, respectivamente. A descoloração foi máxima em pH 2,5 e 3,5 e maiores valores de atividade de lacase foram observados em pH 3,5 para *L. crinitus* e pH 4,5 para *P. castanella*.

Os resultados da descoloração do corante RBBR nos ensaios de validação (média de 86,75 %) estão apresentados na Figura 24 e foram similares ao obtido no PB2 (82 %). Os experimentos de avaliação da adsorção do corante pela biomassa, bem como da adsorção do corante pelo farelo de trigo presente no meio otimizado indicaram que, aproximadamente, 70 % da descoloração do corante foi obtida por meio de adsorção no farelo de trigo (Figura 25). Sendo assim, a descoloração real obtida com a validação do ensaio 2 (PB2) foi de, aproximadamente, 17 %.

Figura 24. Curvas de descoloração do corante RBBR obtidas nos ensaios de validação, realizados em quadruplicata.

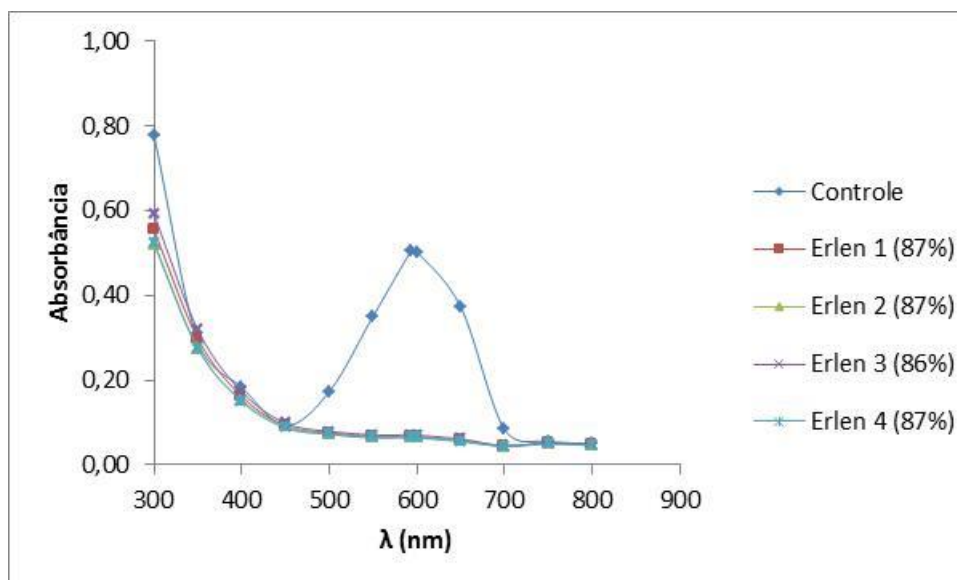
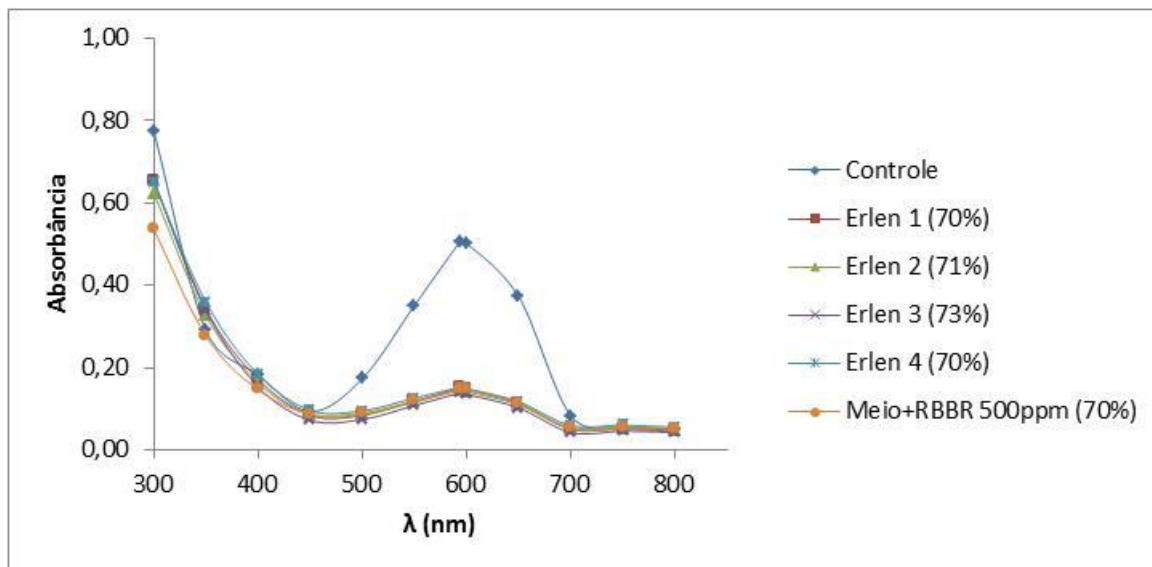
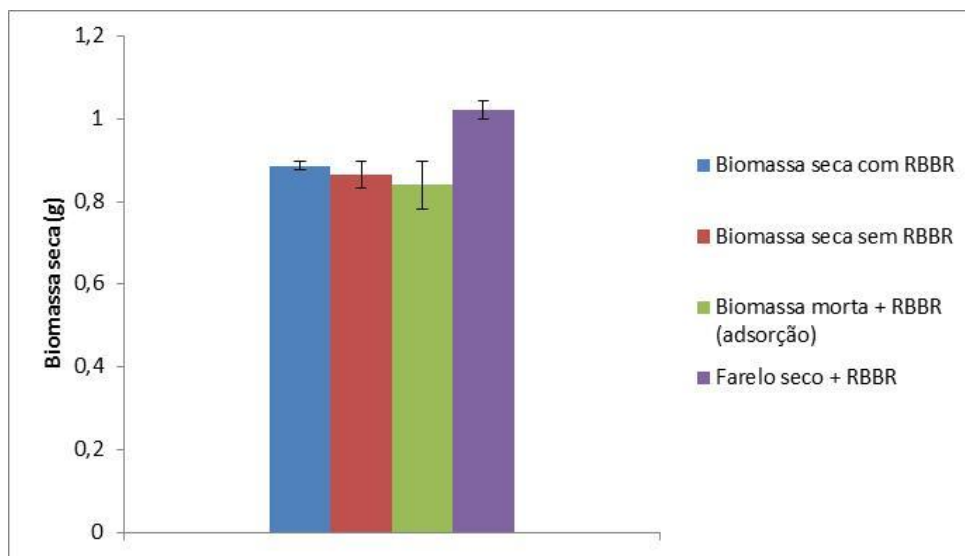


Figura 25. Adsorção do corante RBBR pela biomassa microbiana e pelo farelo de trigo.



Entretanto, a análise da biomassa seca (Figura 26) sugere que o farelo de trigo está sendo consumido pelos micro-organismos do consórcio, visto que na condição contendo meio otimizado e poluente (farelo seco + RBBR), a biomassa não foi alterada. Já nos ensaios contendo os micro-organismos na presença e ausência do poluente (biomassa seca com e sem RBBR) e nos ensaios após adsorção pela biomassa (biomassa morta + RBBR), a biomassa foi menor do que 1g. Esses resultados indicam que, possivelmente, a descoloração do corante por adsorção (70%) seja uma combinação de biomassa + farelo de trigo.

Figura 26. Medidas de biomassa seca após validação do ensaio 2 (PB2)



É importante salientar que os bioensaios (meio otimizado + micro-organismos + corante RBBR 500 ppm), ao final de sete dias de experimento, apresentavam coloração esverdeada clara, enquanto que no controle (meio otimizado + corante RBBR 500 ppm) a coloração permanecia azul, embora em uma intensidade menor do que a inicial, mas ainda assim escura. De acordo com Vitali et al. (2006), durante a degradação da molécula de RBBR, o meio muda sua cor para azul claro, verde e amarelo. Desta forma, a diferença da coloração dos bioensaios e do controle é um indicativo da degradação do corante pelos micro-organismos do consórcio.

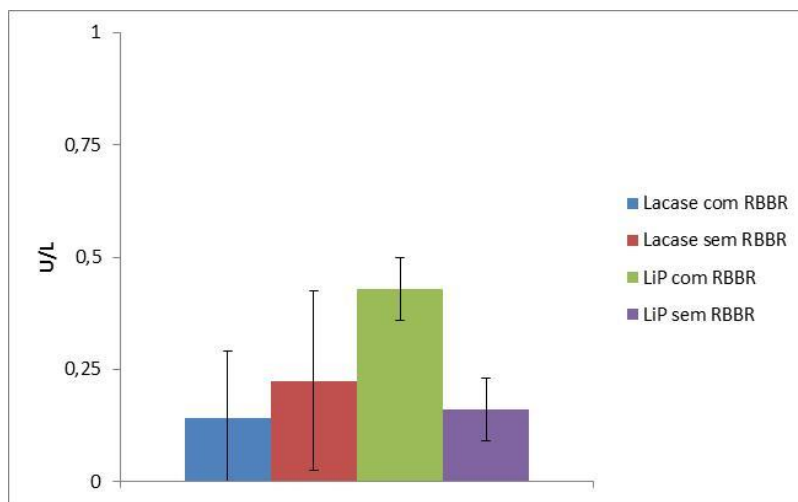
No estudo conduzido por Kaushik e Malik (2011), o planejamento experimental foi utilizado para otimização da descoloração do corante *Acid Navy Blue* pelo incremento da produção de biomassa do fungo *Aspergillus lentulus*. O processo foi afetado por variáveis como ureia, glicose e concentração do corante, que variou de 100 a 300 mg/L (ppm). A máxima remoção do corante, em 24 h, foi de 99,97 % e a capacidade de captação foi de 97,96 mg corante/g de biomassa. Os autores ressaltaram a necessidade de se investigar fontes alternativas de nutrientes, já que a utilização de compostos de alto custo não são comercialmente viáveis em um processo industrial. Nesse contexto, o meio de cultivo otimizado no presente trabalho composto por farelo de trigo e sem adição de outras fontes de nutrientes, foi eficiente na descoloração de 500 ppm do corante RBBR (aproximadamente 90 %), bem como na diminuição da toxicidade do poluente, em sete dias de cultivo. Desta forma, a utilização da combinação biomassa + farelo de trigo na remoção do corante

do meio otimizado pode ser uma alternativa eficaz para o biotratamento de efluentes têxteis.

Diversos estudos reportados em literatura tem demonstrado a utilização de diferentes materiais para a biosorção de corantes, os quais são caracterizados pela eficiência, baixo custo, elevada disponibilidade e insensibilidade a substâncias tóxicas. Dentre esses materiais de biosorção temos: as cascas de amêndoas trituradas, eficiente na remoção do corante *acid blue* 129 de meio aquoso (FAT'HI et al., 2014); carvão ativado derivado de resíduos de romã, para a remoção do corante azul reativo 19 de solução aquosa (RADAEI; ALAVI MOGHADDAM; ARAMI, 2014); e cones de pinha triturados usados na remoção do corante *Basic Red* 46 de sistema aquoso (DENIZ, 2014). Estas são alternativas de baixo custo que podem ser aplicadas na remoção de corantes de meios aquosos. Sendo assim, os dados da literatura corroboram o uso de diferentes resíduos na remoção de corantes de meio aquoso, resultado que foi encontrado no presente trabalho, pela adsorção do corante RBBR no farelo de trigo.

As atividades das enzimas ligninolíticas nos experimentos de validação estão apresentadas na Figura 27. As enzimas ligninolíticas foram pouco expressivas nestes experimentos, sendo apenas produzidas as enzimas lacase e lignina peroxidase em quantidades muito baixas. Sendo assim, não houve evidências claras entre o percentual de destoxificação e de descoloração do RBBR com as atividades das enzimas ligninolíticas, sugerindo que, possivelmente, outras rotas metabólicas estejam envolvidas na destoxificação/descoloração do poluente pelo consórcio 3.

Figura 27. Atividade das enzimas ligninolíticas na condição validada.



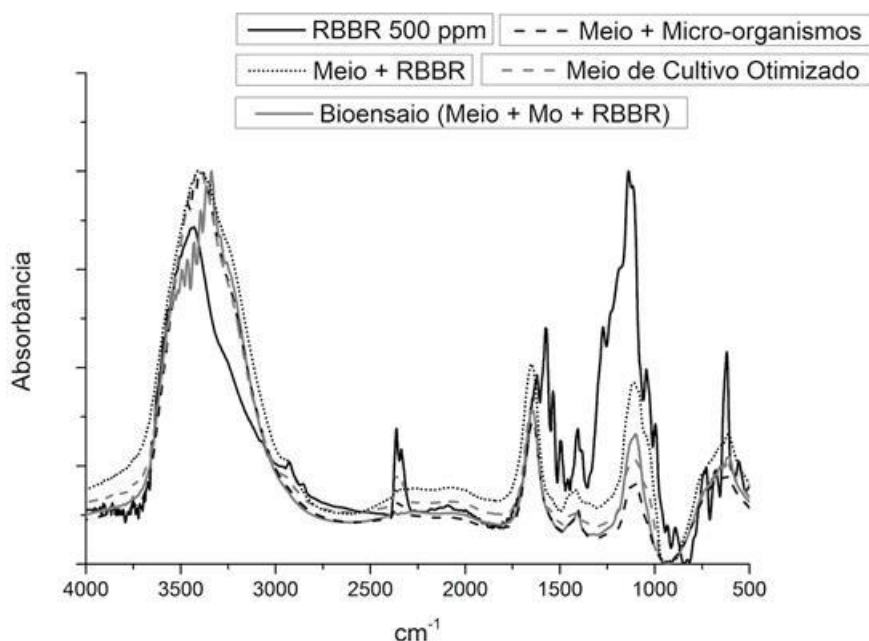
Visando avaliação das possíveis vias metabólicas envolvidas na destoxificação/descoloração do corante RBBR, os ensaios de validação do consórcio 3 (com e sem o poluente) foram submetidos à análise de metatranscriptoma. Os resultados desse estudo estão apresentados e discutidos no Capítulo III.

3.4.1. Análises de FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Complementando as análises da condição validada para destoxificação/descoloração do RBBR estão os dados provenientes da análise de FTIR, que podem ser visualizados na Figura 28. As maiores modificações na estrutura da molécula do corante RBBR, observada pela perda de picos, ocorreram na faixa de 500 – 2000 cm^{-1} . Não ocorreu a formação de novos picos, os quais seriam indicativos da conformação de diferentes cromóforos na molécula. Entretanto, é possível observar claramente que houve alteração nos padrões de banda das condições contendo o corante (bioensaio e meio + RBBR). Quando esses padrões são comparados com o RBBR 500 ppm, é possível observar a diferença na intensidade dos picos.

Na Figura 28 podemos confirmar a capacidade do farelo de trigo para adsorver o corante, pois na condição contendo meio + RBBR, na qual o farelo de trigo estava presente, houve uma queda da intensidade do corante.

Figura 28. Espectro de FTIR comparando RBBR 500 ppm com o bioensaio validado para destoxificação/descoloração do corante e controles.



As análises sugerem ainda que nessa condição também houve modificações da molécula de RBBR, baseando no padrão dos picos das bandas. A queda das bandas para o bioensaio foi ainda maior, ficando muito próximo do perfil de bandas apresentado pelas condições onde o corante não estava presente (meio + micro-organismos e meio de cultivo otimizado), indicando que o corante foi, praticamente, todo removido no bioensaio. Esse resultado, juntamente com os dados visuais de coloração esverdeada do experimento do bioensaio e azul escuro do experimento meio otimizado + RBBR, sugerem que o corante não adsorvido pelo farelo de trigo foi degradado pelos micro-organismos do consórcio, após sete dias de experimento. Os dados ainda sugerem que percentuais mais elevados de degradação do poluente podem ser alcançados em mais dias de experimento.

CAPÍTULO III

METATRANSCRIPTOMA DA CONDIÇÃO VALIDADA DE DESTOXIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL RBBR

1. INTRODUÇÃO

A metatranscriptômica é uma ferramenta que permite a identificação de padrões de expressão gênica em um dado contexto ecológico como, por exemplo, de comunidades microbianas naturais sob diferentes condições ambientais (GILBERT et al., 2008; PORETSKY et al., 2009); em experimentos laboratoriais controlados, para estimar a percepção da comunidade às mudanças específicas no ambiente (PORETSKY et al., 2010) e das vias metabólicas envolvidas nas respostas aos estímulos externos (PORETSKY et al., 2009). As vantagens desta técnica estão relacionadas com análises da diversidade e função da comunidade, *in situ*, em uma perspectiva mais global (DE MENEZES; CLIPSON; DOYLE, 2012), e com a obtenção de um perfil ativo do processo metabólico (SIMON; DANIEL, 2011), que permite uma visão mais real da função ecológica da comunidade analisada. Uma limitação da técnica é a instabilidade das moléculas de mRNA e as dificuldades envolvidas em sua extração (WARNECKE; HESS, 2009).

Hong et al. (2016) estudaram o padrão global de expressão gênica em nível transcripcional da bactéria degradadora de hidrocarboneto *Achromobacter* sp. HZ01, quando cultivada na presença de petróleo como única fonte de carbono e em uma condição controle contendo ácido cítrico como fonte única de carbono. Os autores ressaltaram a importância da análise e da abordagem do estudo na aquisição de dados que elucidem o perfil de expressão gênica de micro-organismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos, no intuito de desenvolver estratégias na remediação de poluentes ambientais.

No estudo conduzido por De Menezes, Clipson e Doyle (2012), foram avaliadas as respostas na expressão gênica da comunidade microbiana de solo contaminado com o HPA fenantreno (e na ausência do poluente), por meio da abordagem da metatranscriptômica. Os autores encontraram importantes expressões diferenciais, quando compararam ambas as condições, o que os levou a ressaltar a importância do trabalho no detalhamento das respostas de comunidades microbianas, frente a poluentes ambientais em solo.

Considerando as vantagens da aplicação do método de avaliação do metatranscriptoma de organismos expostos a diferentes condições ambientais, o objetivo deste capítulo foi o de investigar, por meio do metatranscriptoma das amostras do bioensaio e do controle (sem poluente) do consórcio microbiano 3, os genes expressos nas condições do cultivo validada para a destoxificação/descoloração do corante RBBR, por meio das enzimas e vias metabólicas envolvidas nestes processos, um tema ainda pouco abordado na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade

As biomassas dos ensaios de validação da condição otimizada de destoxificação/descoloração (Ensaio 2 - PB2 - Capítulo II e controle), após centrifugação por 15 min, 13416 *g* e 4 °C foram lavadas em água DEPC por três vezes, para a retirada de resíduo de meio de cultivo e para a inativação de RNases, e preservadas a - 80 °C, até o momento da extração de RNA. Para as análises de metatranscriptômica, o RNA das biomassas dos micro-organismos do consórcio 3 (bioensaio e controle) foi extraído com o auxílio do kit *RNeasy® Plant Mini kit* (Qiagen), de acordo com protocolo do fabricante. Os RNA extraídos foram tratados com DNase (*Thermo Scientific*), para a retirada de DNA interferente. Esses ensaios foram realizados em triplicata.

A quantificação do RNA extraído e tratado com DNase foi realizada em espectrofotômetro para ácidos nucleicos *Thermo Scientific NanoDrop 2000*.

Para a verificação da integridade do RNA das amostras, foi feito um gel de agarose a 0,7 %. Após a corrida em cuba de eletroforese pequena, para oito poços sob 80 V por 1h, o gel de agarose passou por banho em SyBr[®] *Safe* (Invitrogen) (15 µL/ 200 mL de água deionizada) por 1 h, para coloração das bandas.

2.2. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

As amostras de RNA (bioensaio e controle) com concentração e qualidade adequadas foram enviadas para a empresa Macrogen, na Coreia do Sul, onde foram sequenciadas na plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) *Illumina HiSeq2500, paired-end 2 x 100 pb*, em uma *lane* do sequenciador. Esta atividade foi

custeada pelo projeto Fapesp 2013/19486-0, intitulado “Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações”, sob a coordenação da Prof. Dra. Lara Durães Sette, ao qual o presente estudo de Doutorado está associado.

2.3. Montagem de banco de dados de genes de enzimas específicas

Para as análises de metatranscriptoma, foi estruturado um banco de dados, por busca no *GenBank* (NCBI), de sequências gênicas de enzimas específicas dos micro-organismos do consórcio (e de organismos próximos, em nível de ordem e família) que, segundo a literatura, estão possivelmente envolvidas em processos de degradação de poluentes ambientais.

Dessa forma, para os quatro micro-organismos do consórcio 3 (*Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *M. racemosus* CBMAI 847, *Dietzia maris* CBMAI 705 e *Bacillus subtilis* CBMAI 707), foi estruturado um banco de 414 sequências, representado na Tabela 16, na qual estão as enzimas e o número correspondente das sequências encontradas, para cada organismos, respectivamente. A partir desse banco de dados foi realizada comparação com as sequências totais dos metatranscriptomas (bioensaio e controle), utilizando a ferramenta BlastN.

Tabela 16. Banco de genes de enzimas possivelmente envolvidas na degradação de poluentes ambientais.

	<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	<i>M. racemosus</i> CBMAI 847	<i>D. maris</i> CBMAI 705	<i>B. subtilis</i> CBMAI 707
Enzimas ligninolíticas (Lacase, LiP e MnP)	135	---	---	5
Citocromo P-450	104	8	33	14
<i>Dye-Type</i> peroxidase	25	---	1	---
Epóxido hidrolase	23	---	---	---
Glioxal oxidase	9	---	---	---
Quinona redutase	7	---	---	---
Versátil peroxidase	6	---	---	---
Dioxigenases	6	---	---	---
Alcano monoxigenase	---	---	27	---
Catechol dioxigenases	---	---	10	1

--- sequências não encontradas para o organismo

2.4. Pré-processamento dos *reads*

As análises *in silico* dos dados de metatranscriptoma provenientes da empresa MacroGen foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Evolução Molecular (LEM) na UNESP de Rio Claro, coordenado pelo Prof. Maurício Bacci Júnior, com o auxílio da especialista em Bioinformática Dra. Milene Ferro. Todas as etapas das análises foram realizadas em um servidor de alto desempenho, com Sistema Operacional Linux/Debian e com 96GB de memória RAM, 8TB de espaço em disco e 24 núcleos de processamento. Além disso, todas as ferramentas foram executadas localmente no servidor, o que otimizou o tempo de processamento.

As sequências (*reads*) recebidas da MacroGen passaram por um controle de qualidade, utilizando-se o programa FASTQC (versão 0.11.3), que faz uma análise geral dos *reads* obtidos após sequenciamento, quanto à qualidade *Phred* por base da sequência, tamanho, presença de Ns e sequências contendo adaptadores utilizados na etapa de preparação da biblioteca para sequenciamento. Posteriormente, todos os *reads* foram passados no programa FASTX Toolkit Trimmer (versão 0.0.14), para eliminar os primeiros 15 nucleotídeos, devido ao desvio do conteúdo GC, proveniente de sequenciamentos na plataforma Illumina (HANSEN; BRENNER; DUDOIT, 2010). Além disso, foi feita a trimagem dos *reads* e foram mantidos somente aqueles contendo bases de *Phred* > 30, ou seja, probabilidade de 1 erro a cada 1000 bases (EWING et al., 1998), com o auxílio do programa SeqyClean. Novamente, utilizando-se o programa FASTQC, os *reads* foram verificados de acordo com a qualidade resultante do pré-processamento. Por último, foi feita com auxílio do programa Trinity (versão 2.0.6), a normalização dos *reads*, para a retirada daqueles redundantes, o que otimiza a montagem dos *contigs*.

2.5. Montagem dos *contigs*, busca por genes específicos e anotação

Os *reads* normalizados foram montados em *contigs* (sequências de genes) com auxílio do programa Trinity (versão 2.0.6) (GRABHERR et al., 2011). As sequências foram filtradas em tamanho mínimo de 300 pb (100 aminoácidos).

Após a formação dos *contigs*, foi realizada uma busca de genes específicos das enzimas possivelmente envolvidas na degradação de poluentes ambientais (banco de dados montado no item 2.3) no conjunto total de sequências dos

metatranscriptomas (bioensaio e controle), utilizando a ferramenta *BlastN*. Para a anotação funcional desses genes específicos, foi utilizada a técnica de *Novo assembly* (montagem de bibliotecas de transcritos sem a necessidade de um genoma como referência) e as sequências codificadoras para tais enzimas específicas foram analisadas pelo programa *Blast2GO* (CONESA et al., 2005), para a atribuição dos termos de GO (*Gene Ontology*) e de EC (*Enzyme Commission number*), bem como para a busca de possíveis rotas metabólicas das quais as enzimas participam, com o auxílio do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Essa técnica tem expandido a possibilidade de análises de bibliotecas para organismos menos estudados ou recém descobertos (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010).

O pré-processamento e a montagem de *contigs* foram realizados para os metatranscriptomas do bioensaio e do controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração de RNA, quantificação e verificação de integridade

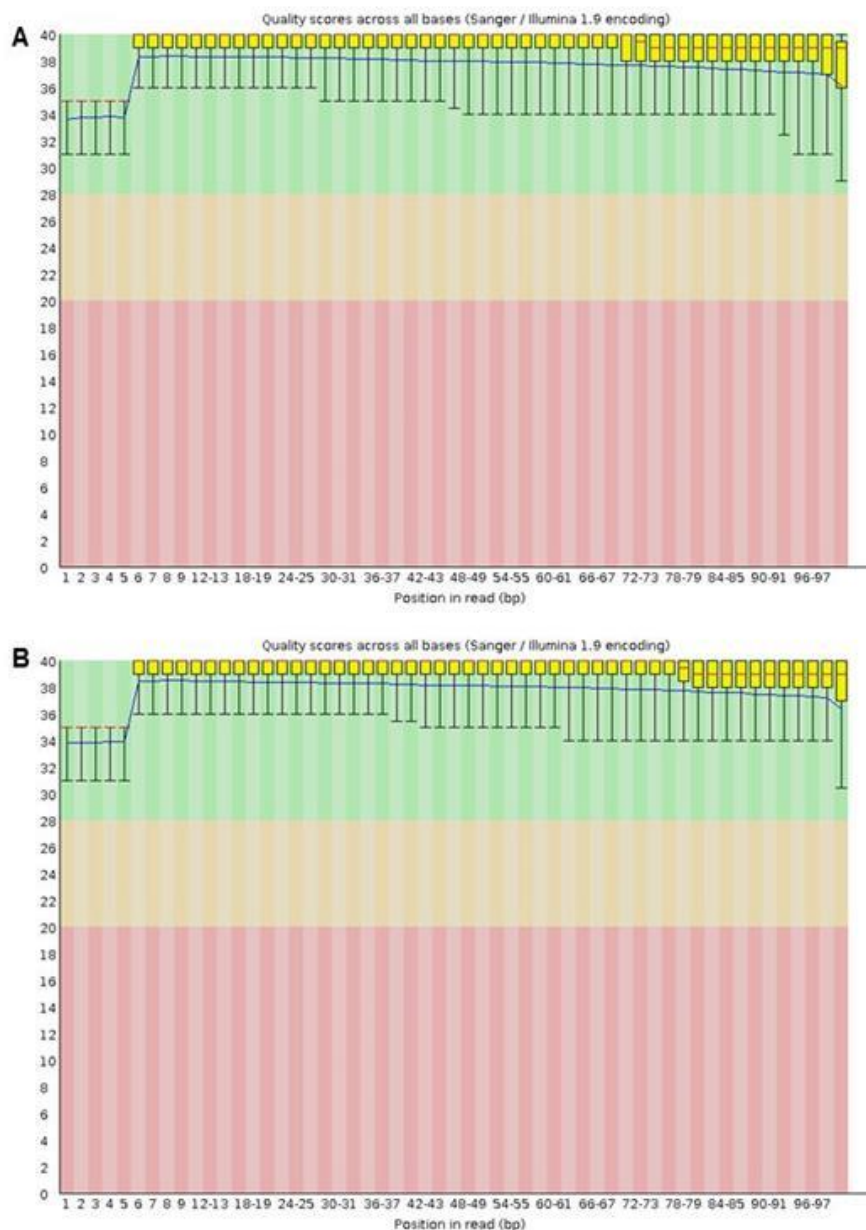
Os RNAs extraídos com o kit *RNeasy® Plant Mini kit* (Qiagen) das amostras do bioensaio e do controle apresentaram concentrações e qualidade adequadas e foram enviadas para a MacroGen. Porém, em análises de qualidade do RNA realizadas pela empresa, das triplicatas de cada amostra enviada, somente uma réplica de cada apresentava RIN (*Integrity Number*) próximo de 7 (mínimo exigido) e estavam aptas para o sequenciamento na plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) Illumina *HiSeq2500*. A quantificação do RNA das amostras consideradas adequadas pela MacroGen foi de 399,2 ng/μL (15,9 μg total), para o bioensaio, e 247,8 ng/μL (9,9 μg total), para o controle.

3.2. Pré-processamento dos reads

A empresa disponibilizou os dados dos sequenciamentos (*reads*) em formato FASTQ, para download. Inicialmente, as amostras do bioensaio e controle continham mais de 319 e 348 milhões de *reads*, respectivamente, com tamanho de 100 pares de bases cada e, aproximadamente, 95 % de ambos os conjuntos de *reads* apresentavam *Phred* > 30.

O controle de qualidade inicial dos *reads* foi feito usando o programa FASTQC (versão 0.11.3). Na Figura 29 é possível observar graficamente a qualidade, quanto aos valores médios de *Phred* por base. É possível observar que os *reads* já continham elevada qualidade com *Phred* médio por base acima de 36, para ambas as amostras. Outros resultados provenientes do programa FASTQC mostraram que não havia base identificada como N, nem adaptadores que são sequências usadas para ligar o fragmento de cDNA na placa do sequenciador, para que ocorra amplificação.

Figura 29. Representação gráfica gerada pelo programa FASTQC da qualidade *Phred* média por base dos *reads*, antes do pré-processamento. (A) bioensaio e (B) controle.



Devido o alto conteúdo de GC proveniente do sequenciamento na Plataforma Illumina, as 15 primeiras bases de cada *read* foram trimadas (cortadas) com o auxílio do programa *FASTX Toolkit Trimmer* (versão 0.0.14). Ficou ainda estabelecido no pré-processamento uma filtragem dos *reads*, mantendo somente aqueles com *Phred* > 30. Tal passo foi realizado com o auxílio da ferramenta *SeqyClean*.

Novamente foi avaliada a qualidade dos *reads* com o programa *FASTQC*. A Figura 30 apresenta graficamente a qualidade, quanto aos valores médios de *Phred* por base, após o pré-processamento, ficando a qualidade dos *reads* bastante elevada, com *Phred* médio por base acima de 38. A Figura 31 ilustra a qualidade média dos *reads*, após o pré-processamento, mostrando a eficácia desta etapa, resultando em *reads* com qualidade média de 39 para ambas as amostras.

Figura 30. Representação gráfica gerada pelo programa FASTQC da qualidade *Phred* média por base dos *reads*, após etapas do pré-processamento com o auxílio dos programas FASTX Toolkit Trimmer e SeqyClean. (A) bioensaio e (B) controle.

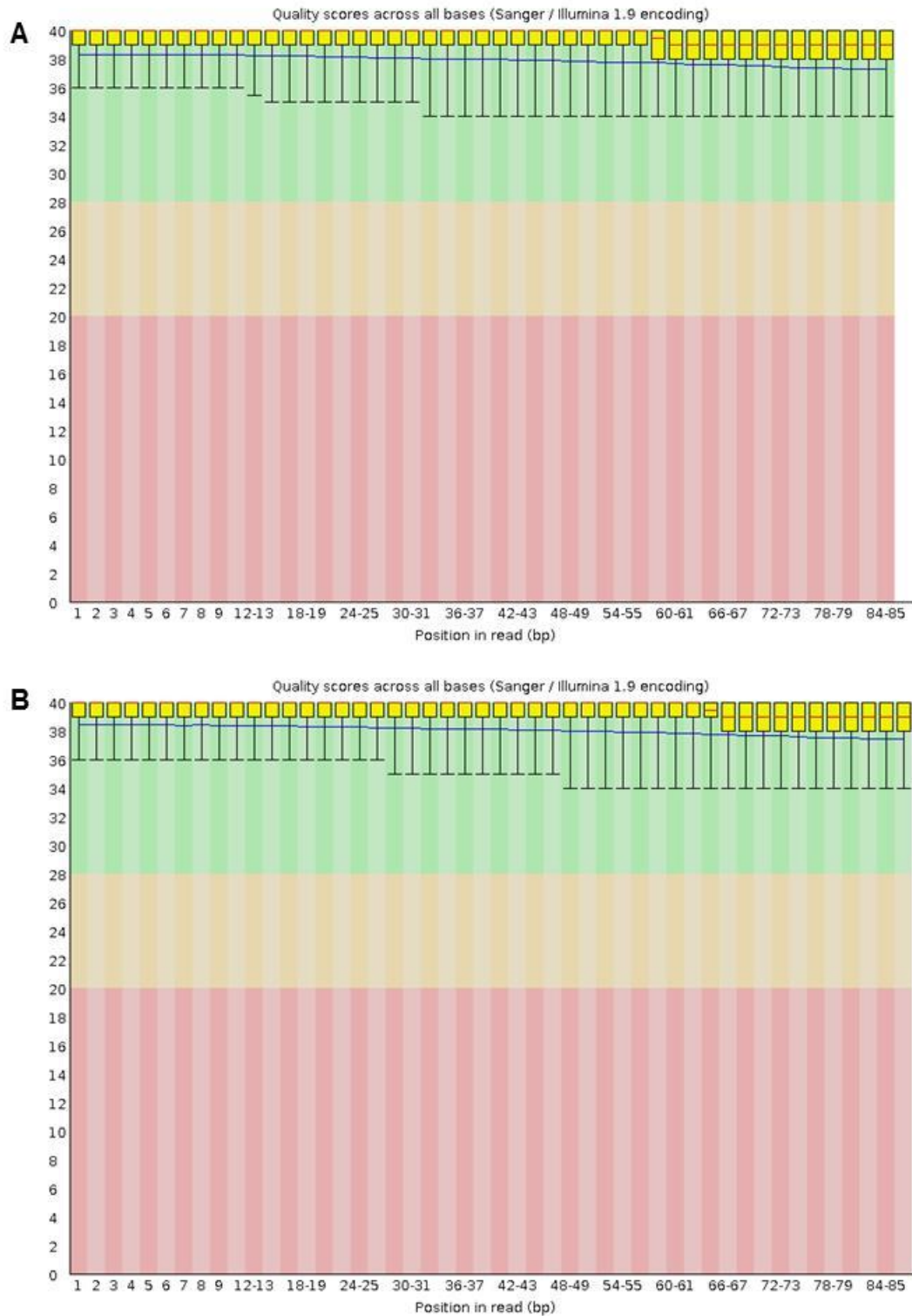
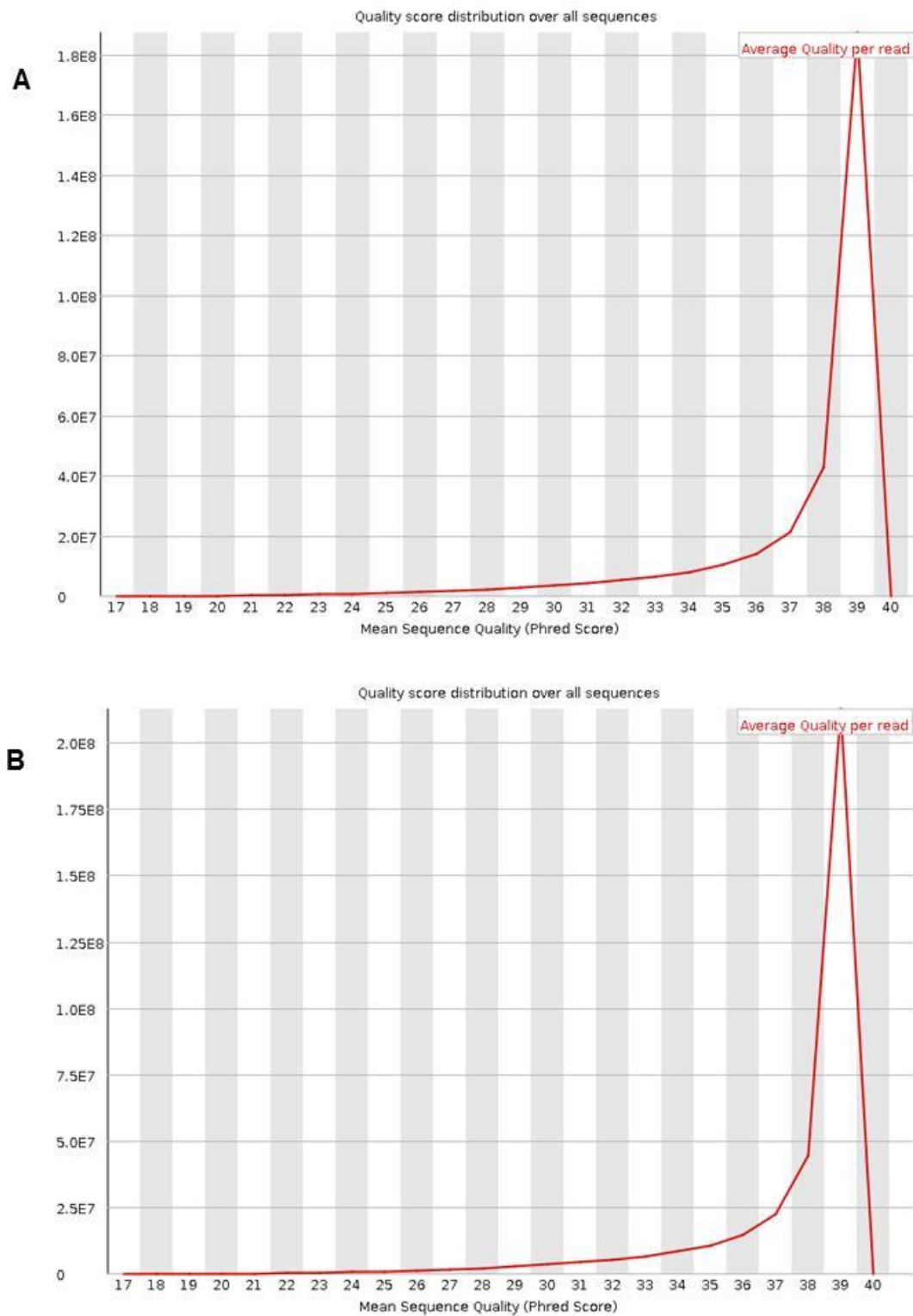


Figura 31. Gráfico gerado pelo programa FASTQC, mostrando a qualidade *Phred* por sequência. (A) bioensaio e (B) controle.



A Tabela 17 demonstra a quantidade inicial e final de *reads*, após as etapas de pré-processamento. É possível afirmar que houve perdas mínimas (menores que 0,2 %) no número total de *reads*, após o pré-processamento, indicando a elevada qualidade das sequências desde o início das análises *in silico*.

Tabela 17. Quantidade de *reads*, antes e após pré-processamento.

	Bioensaio	Controle
<i>Reads</i> iniciais	319.352.472	348.638.552
<i>Reads</i> após pré-processamento	318.760.776	348.151.856

3.3. Montagem dos *contigs*, busca por genes específicos e anotação

A montagem das sequências realizada com auxílio do programa *Trinity* (versão 2.0.6) gerou, para o bioensaio e controle, 48.519 e 42.428 *contigs*, respectivamente. O total de *contigs* ainda foi filtrado por tamanho de sequência, permanecendo somente aquelas com mais de 300 pb, o equivalente a 100 aminoácidos. A Tabela 18 representa o número de *contigs* totais montados e após filtragem, totalizando aproximadamente, 80 % do número total de *contigs* iniciais.

Tabela 18. *Contigs* totais e ao final, após filtragem por tamanho de sequência (300 pb).

	Bioensaio	Controle
<i>Contigs</i> iniciais	48.519	42.428
<i>Contigs</i> após filtro por tamanho (300 pb)	38.684	33.945

Com o intuito de direcionar e simplificar as análises de ambos os metatranscriptomas, foi estruturado um banco de dados contendo 414 sequências gênicas de enzimas possivelmente envolvidas em processos de degradação de poluentes ambientais, utilizando como referência os micro-organismos do consórcio 3 (*Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, *M. racemosus* CBMAI 847, *D. maris* CBMAI 705 e *B. subtilis* CBMAI 707) e outros organismos próximos, em nível de ordem e família. Com o auxílio da ferramenta *BlastN* (ALTSCHUL et al., 1990), foi feita a busca dos genes específicos no conjunto total de sequências dos metatranscriptomas. Das 414

sequências, somente 54 foram encontradas no conjunto total de sequências dos metatranscriptomas, sendo 32 para o metatranscriptoma do bioensaio e 22 para o controle. O baixo número de sequências de genes específicos recuperados dos metatranscriptomas totais pode ter ocorrido devido às diferenças filogenéticas entre os micro-organismos utilizados como referência para a estruturação do banco de dados de genes de enzimas degradadoras de poluentes ambientais. Por ser o ambiente marinho ainda pouco explorado no âmbito dos recursos genéticos microbianos, nenhuma sequência foi encontrada para o gênero *Marasmiellus*, por exemplo, para compor o banco de dados estruturado.

Para as 54 sequências específicas de enzimas possivelmente envolvidas em processos de degradação do RBBR, recuperadas do total de transcritos das condições do bioensaio e do controle, foi utilizado o programa *Blast2Go* (anotação funcional). Esse programa descreve os genes pela pesquisa no banco de dados NR (não redundante) do NCBI (*GenBank*), para categorizá-los em ontologias gênicas (GO), atribuir números enzimáticos (*Enzyme Comission number*) e para propor rotas metabólicas das quais as enzimas possam fazer parte, com auxílio do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

A Tabela 19 e a Figura 32 apresentam os dados das 32 enzimas específicas recuperadas do metatranscriptoma do bioensaio, já com a atribuição de número EC, via metabólica em que atua (as rotas completas das quais as enzimas participam estão disponíveis nos ANEXOS 4 – 22), segundo KEGG, assim como as principais classes dessas enzimas. A Tabela 20 e a Figura 33 trazem as 22 enzimas específicas encontradas no metatranscriptoma do controle, número EC e vias metabólicas (as rotas completas das quais as enzimas participam estão disponíveis nos ANEXOS 23 e 24). As principais classes de enzimas encontradas no bioensaio foram as oxirredutases e hidrolases (Figura 32), sendo que no caso do experimento controle, além dessas duas classes de enzimas, foram também encontradas as transferases (Figura 33).

Várias das enzimas encontradas após a anotação são atuantes em vias metabólicas basais dos organismos, como metabolismo de aminoácidos e glicólise (Tabelas 19 e 20). Para o bioensaio, oito enzimas, do total de 32 (25%), estão relacionadas com vias metabólicas de xenobióticos/poluentes/drogas (Tabela 19), enquanto que para o controle três enzimas, do total de 22 (13%), participam de

metabolismo de xenobiótico (Tabela 20). Esses resultados indicam que houve a ativação de mais rotas destoxicadoras no bioensaio do que no controle.

No experimento do bioensaio foram expressas diversas enzimas atuantes em rotas metabólicas de degradação de compostos xenobióticos/poluentes/drogas (destacadas em negrito na Tabela 19), incluindo principalmente enzimas da citocromo P450 (alfa-beta hidrolase, NADPH-citocromo redutase, mono-oxigenases e epóxido hidrolase), degradação de clorociclohexano e clorobenzeno, benzoato, fluorobenzoato e tolueno (dioxigenase) e degradação de caprolactamo (alcano 1-mono-oxigenase). Apesar do experimento controle não conter o corante RBBR, as enzimas participante do metabolismo de xenobiótico por citocromo P450, alfa-beta hidrolase e epóxido hidrolase também foram encontradas (destacadas na Tabela 20). Esses resultados sugerem que tais enzimas possam fazer parte do metabolismo dos componentes do meio de cultivo, pois foram encontradas na mesma proporção no controle e no bioensaio. A conformação alfa/beta-hidrolase está presente em uma série de enzimas, incluindo proteases, lipases, peroxidases, esterases, epóxido hidrolases e dehalogenases (OLLIS et al., 1992).

Enzimas expressas apenas no experimento do bioensaio estão relacionadas à degradação de alcanos (alcano 1-mono-oxigenase) e de compostos aromáticos, como os derivados de acetofenona (4-hidroxiacetofenona mono-oxigenase), ciclohexanona (ciclohexanona mono-oxigenase) e outros (dioxigenases). De acordo com Táncsics et al. (2015), as enzimas alcano hidroxilases desempenham papel relevante na biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo. A ciclohexanona mono-oxigenase (CHMO) é uma flavoenzima que efetua uma reação de inserção de oxigênio sobre ciclo-hexanona, para formar o epsilon-caprolactona (SHENG; BALLOU; MASSEY, 2001). As dioxigenases catalisam a incorporação de dois átomos de oxigênio em substratos, por meio de uma variedade de mecanismos, sendo a quebra de anéis aromáticos uma das mais importantes funções dessas enzimas. As enzimas que pertencem à família intradiol incluem a catecol 1,2-dioxigenase (1,2-CTD) (EC:1.13.11.1); protocatecoato 3,4-dioxigenase (3,4-PCD) (EC:1.13.11.3); e clorocatecol 1,2-dioxigenase (EC:1.13.11.1) (FERRARONI et al., 2004). Todas as enzimas acima mencionadas são produzidas principalmente por bactérias, o que corrobora a hipótese formulada no Capítulo II de que o pH do meio estaria favorecendo o desenvolvimento das bactérias do consórcio estudado.

Experimentos adicionais utilizando os micro-organismos do consórcio 3, em separado e também em diferentes combinações, poderia ajudar a elucidar o papel dos fungos filamentosos e das bactérias na destoxificação, degradação e descoloração do RBBR.

Em outro trabalho do grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette, foi utilizada a mesma abordagem para direcionar a busca de genes específicos de enzimas possivelmente envolvidas na degradação do pireno pelo fungo de origem marinha *Chaunopycnis alba* CBMAI 1464 (VASCONCELOS, 2015). De um total de 94 sequências estruturadas em um banco de dados de genes específicos, 10 foram encontradas no transcriptoma do fungo, as quais foram relacionadas com enzimas do complexo P450 mono-oxigenase e epóxido hidrolase. Diferentemente do que foi encontrado no presente trabalho, somente uma enzima foi categorizada como sendo do grupo das hidrolases. Cabe ressaltar que no trabalho realizado por Vasconcelos (2015) não foi avaliada a expressão de enzimas em um experimento controle (na ausência do pireno).

No estudo reportado por Hong et al. (2016), relacionado à caracterização do transcriptoma da bactéria degradadora de hidrocarbonetos *Achromobacter* sp. HZ01, após tratamento com petróleo, um total de 38.706.280 e 38.954.413 de *reads* foram obtidos do RNA-seq (plataforma Illumina), para a bactéria tratada com petróleo e para o controle contendo ácido cítrico como única fonte de carbono, respectivamente. O tratamento com petróleo influenciou significativamente o perfil transcricional da bactéria, envolvendo 742 genes diferencialmente expressos, após anotação completa do transcriptoma (3485 transcritos anotados). Segundo os autores, foram ativadas vias do metabolismo dos ácidos graxos e parte de mono-oxigenases e desidrogenases, enquanto o ciclo do ácido cítrico foi inativado. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, já que também foram encontradas mono-oxigenases e desidrogenases, classificadas como oxirredutases (EC 1) e houve ativação da via de degradação dos ácidos graxos (Tabela 19 e Figura 32). Os autores ressaltam ainda que no processo de degradação do petróleo um grande número de ácidos graxos é produzido nas células bacterianas e devem estar envolvidas, para finalizar a degradação do hidrocarboneto, enzimas suficientes de metabolização de ácidos graxos. Uma ressalva dos autores é que mais estudos sejam realizados sobre o transcriptoma envolvido no complexo processo de

degradação do petróleo e que a intenção do trabalho era ter uma visão do processo inicial de degradação do poluente pela bactéria *Achromobacter* sp. HZ01. O número de *reads* obtidos por Hong et al. (2016) corresponde a aproximadamente 12% dos *reads* obtidos no presente trabalho, indicando a grande quantidade de dados que serão gerados, após a anotação completa dos metatranscriptomas do consórcio 3, os quais poderão trazer contribuições na elucidação do metabolismo de poluentes ambientais por consórcio microbiano.

Um estudo relacionado com a investigação de respostas da comunidade microbiana de solo contaminado com o HPA fenantreno, utilizando a abordagem da metatranscriptômica, foi reportado por De Menezes, Clipson e Doyle (2012). Para tanto, foi realizado sequenciamento do metatranscriptoma na plataforma Roche 454, sendo o conjunto de dados final composto por 35.720 e 52.728 sequências, para solo com fenantreno e controle, respectivamente. O solo com fenantreno levou ao aumento da transcrição de enzimas associadas ao metabolismo de compostos aromáticos, respiração celular e respostas a estresse. Em geral, a expressão de transcritos classificados como dioxigenases e genes associados ao estresse e destoxificação aumentou na presença de fenantreno. De acordo com Cerniglia (1992), as dioxigenases realizam papel central no estágio inicial do metabolismo de fenantreno. No presente estudo, uma dioxigenase também foi expressa no experimento do bioensaio (*intradiol ring-cleavage dioxygenase*), indicando participação na degradação do corante RBBR (Tabela 19).

Tabela 19. Nome do *contig*, descrição do gene advinda da pesquisa no banco de dados NR do NCBI e o número da enzima (EC) - Bioensaio. As enzimas envolvidas em vias metabólicas de degradação de xenobióticos/poluentes/drogas estão destacadas em negrito.

Nome <i>contig</i>	Descrição <i>BlastX</i>	EC number	Via metabólica
TR61 c0_g1_i1_3A TR266 c0_g2_i1_3A	alpha beta-hydrolase cytochrome p450 monooxygenase pc-3	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR1338 c0_g1_i1_3A	NADPH-cytochrome reductase	EC:1.6.2.4; EC:1.14.14.1	EC:1.14.14.1 Biossíntese de hormônio esteroide/ Metabolismo da cafeína/ Metabolismo de triptofano/ Metabolismo de ácido aracdônico/ Metabolismo do ácido linoleico/ Degradação de aminobenzoato/ Metabolismo do retinol em animais/ Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR1757 c0_g3_i4_3A TR2373 c0_g1_i1_3A TR3296 c0_g3_i1_3A TR4056 c0_g1_i2_3A TR4216 c0_g1_i1_3A TR4528 c0_g1_i1_3A TR4681 c0_g1_i1_3A	monooxygenase cytochrome p450 multicopper oxidase glyoxal oxidase cytochrome p450 epoxide hydrolase cytochrome P450		
TR9428 c0_g1_i1_3A	4-hydroxyacetophenone monooxygenase	EC:1.14.13.8	Metabolismo de drogas por Citocromo P450
TR10152 c0_g1_i1_3A	cyclohexanone monooxygenase	EC:1.14.13.8	Metabolismo de drogas por Citocromo P450
TR10265 c0_g1_i1_3A	epoxide hydrolase	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR12416 c0_g1_i1_3A	epoxide hydrolase	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR13600 c0_g1_i1_3A TR15807 c0_g1_i1_3A TR16934 c0_g1_i1_3A TR17715 c0_g1_i1_3A	di-copper centre-containing copper oxidase lanosterol 14-alpha-demethylase FLAG-tagged alkane hydroxylase-rubredoxin	EC:1.14.13.70	Biossíntese de esteroides
TR18985 c0_g2_i1_3A TR19057 c0_g1_i1_3A TR21203 c0_g4_i2_3A TR21839 c0_g1_i1_3A	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) homodimeric type cytochrome P450 monooxygenase pc-1 NADPH--cytochrome P450 reductase glyoxal oxidase	EC:1.2.4.1 EC:1.6.2.4	Glicólise e Gliconeogênese/ Ciclo do ácido cítrico/ Metabolismo do piruvato
TR25955 c0_g1_i1_3A TR27616 c0_g1_i1_3A	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase cytochrome p450	EC:1.18.1.3	Degradação de ácidos graxos

TR28080 c0_g1_i1_3A	flavin-containing monooxygenase		
TR28223 c0_g1_i1_3A	ubiquinol-cytochrome c reductase		
TR28389 c0_g1_i1_3A	cytochrome c1 subunit		
TR28851 c0_g1_i1_3A	cytochrome P450		
TR28851 c0_g1_i1_3A	cytochrome p450		
TR30467 c0_g1_i1_3A	intradiol ring-cleavage dioxygenase	EC:1.13.11.1	Degradação de clorociclohexano e clorobenzeno/ Degradação de benzoato/ Degradação de fluorobenzoato/ Metabolismo do tolueno
TR30934 c0_g1_i1_3A	multicopper oxidase		
TR31934 c0_g1_i1_3A	cytochrome P450		
TR33575 c0_g1_i1_3A	alkane 1-monooxygenase	EC:1.14.15.3	Degradação de ácidos graxos/ Degradação de caprolactamo

Tabela 20. Nome do *contig*, descrição do gene advinda da pesquisa no banco de dados NR do NCBI e o número da enzima (EC) – Controle. As enzimas envolvidas em vias metabólicas de degradação de xenobióticos/poluentes/drogas estão destacadas em negrito.

Nome <i>contig</i>	Descrição <i>BlastX</i>	EC number	Via metabólica
TR1142 c0_g1_i1_1C	alpha beta-hydrolase	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR2545 c0_g1_i1_1C	alpha beta-hydrolase		
TR5091 c0_g1_i1_1C	alkane 1-monooxygenase		
TR5604 c0_g1_i1_1C	alpha beta-hydrolase		
TR6317 c0_g1_i1_1C	GDP-mannose pyrophosphorylase		
TR6919 c0_g1_i1_1C	epoxide hydrolase		
TR7137 c0_g1_i1_1C	laccase		
TR8101 c0_g1_i1_1C	NADPH--cytochrome P450 reductase	EC:1.6.2.4	
TR9695 c0_g1_i2_1C	cytochrome P450		
TR11091 c0_g1_i1_1C	epoxide hydrolase	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR14320 c0_g1_i1_1C	cytochrome p450		
TR16198 c0_g1_i1_1C	epoxide hydrolase	EC:3.3.2.9	Metabolismo de xenobiótico por Citocromo P450
TR21274 c0_g1_i1_1C	cytochrome p450		
TR21480 c0_g1_i1_1C	cytochrome P450		
TR23846 c0_g1_i14_1C	cytochrome p450		
TR23866 c0_g1_i12_1C	cytochrome p450		
TR24150 c0_g1_i1_1C	laccase	EC:1.10.3.2	
TR24497 c0_g1_i1_1C	cytochrome p450 monooxygenase pc-3		
TR25524 c0_g1_i1_1C	cytochrome p450 monooxygenase pc-3		
TR25599 c0_g1_i20_1C	cytochrome p450 monooxygenase pc-3		
TR26632 c0_g1_i1_1C	two-component sensor histidine kinase	EC:2.7.3; EC:3.3.1.1	(EC 3.3.1.1) Metabolismo da cisteína e metionina
TR28905 c0_g1_i1_1C	protoplast secreted 2 precursor		

Figura 32. Principais classes enzimáticas para o bioensaio.

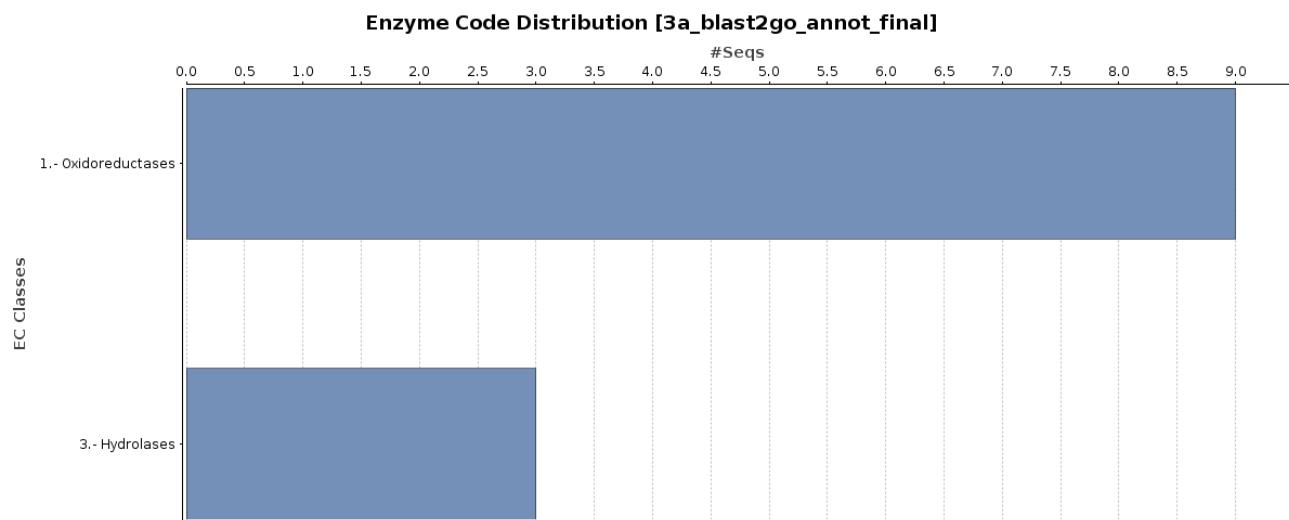
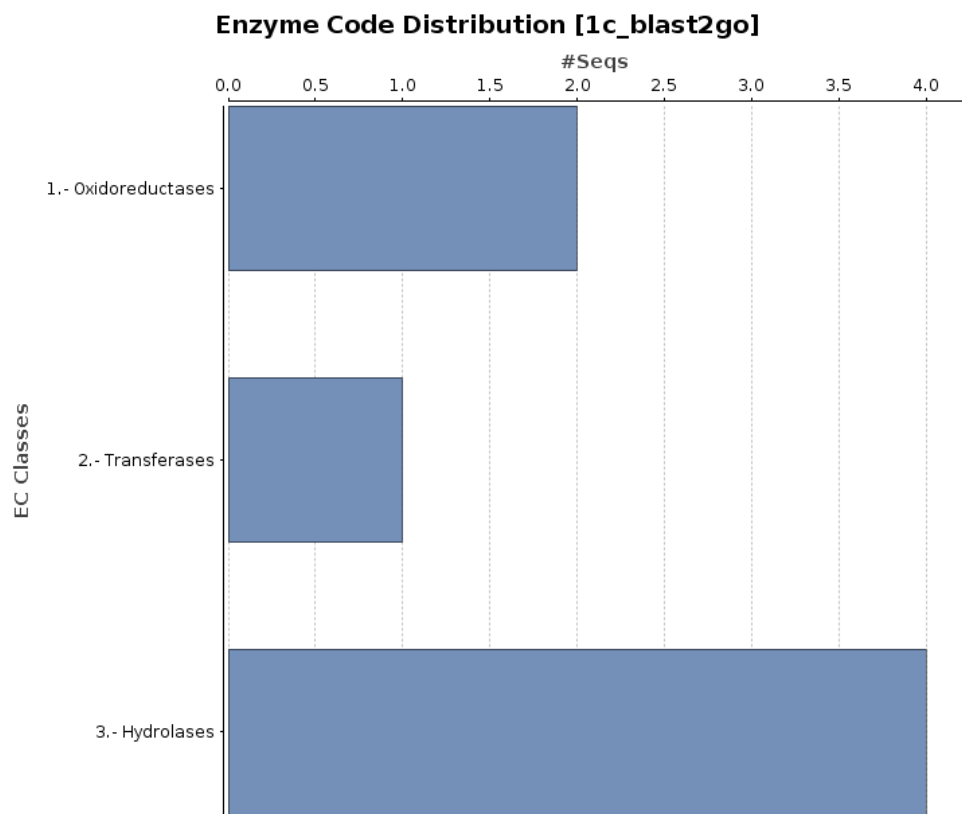
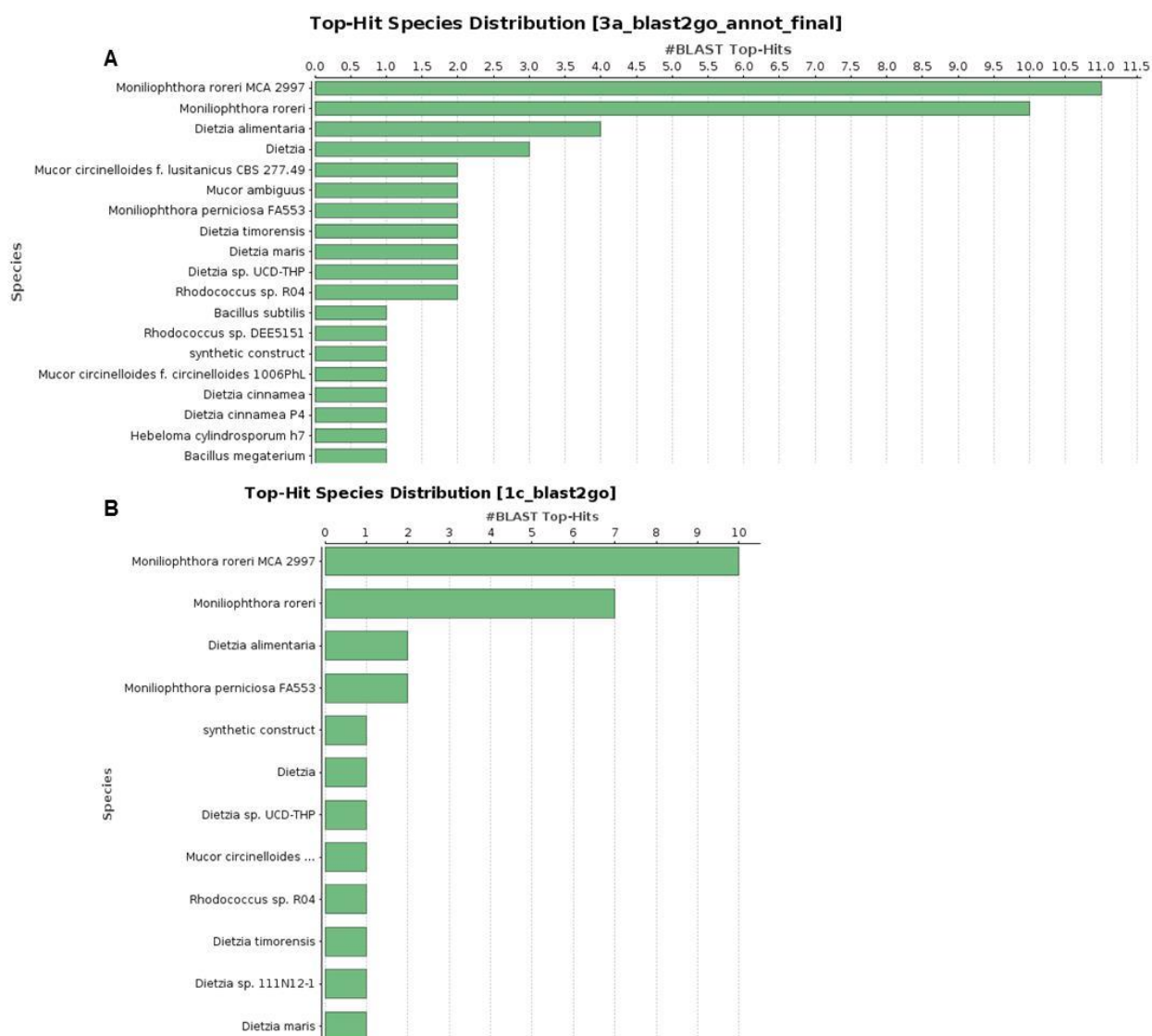


Figura 33. Principais classes enzimáticas para o controle.



A Figura 34 apresenta o gráfico gerado pelo programa *Blast2GO* da lista de espécies do NCBI, que tiveram *hits* de BLAST com os *contigs* anotados para os genes de enzimas específicas envolvidas na degradação de poluentes. Um grande número de sequências dos metatranscriptomas, tanto do bioensaio quanto do controle, estava relacionado a diferentes espécie de *Moniliophthora*, um gênero pertencente à mesma família do fungo *Marasmiellus* sp. (*Marasmiaceae*), indicando a similaridade metabólica desses organismos. O fungo *Hebeloma cylindrosporum* pertence à mesma ordem do fungo *Marasmiellus* (*Agaricales*). Sequências relacionadas às espécies do gênero *Dietzia* também foram bastante representadas em ambos os gráficos. *Rhodococcus* e *Dietzia* pertencem à mesma ordem (*Actinomycetales*) e podem, possivelmente, apresentar similaridade metabólica. Sequências provenientes do gênero *Mucor* e *Bacillus* foram pouco representadas em ambos os metatranscriptomas, sendo que as sequências de *Bacillus* estavam ausentes no experimento controle. Cabe destacar que a baixa representatividade de sequências relacionadas a esses organismos pode estar associada com as limitações no momento de estruturar o banco de dados (Tabela 16), já que havia poucas sequências desses organismos disponíveis no banco de dados do *GenBank*, para as enzimas em questão. O não aparecimento de organismos distantes daqueles dos consórcios, pode ser um indicativo de ausência de contaminação no processo.

Figura 34. Gráfico obtido pelo *Blast2GO*, baseado em dados do NCBI (*GenBank*) de organismos que apresentaram similaridade com as sequências (específicas) do metatranscriptoma do consórcio microbiano. (A) bioensaio e (B) controle.

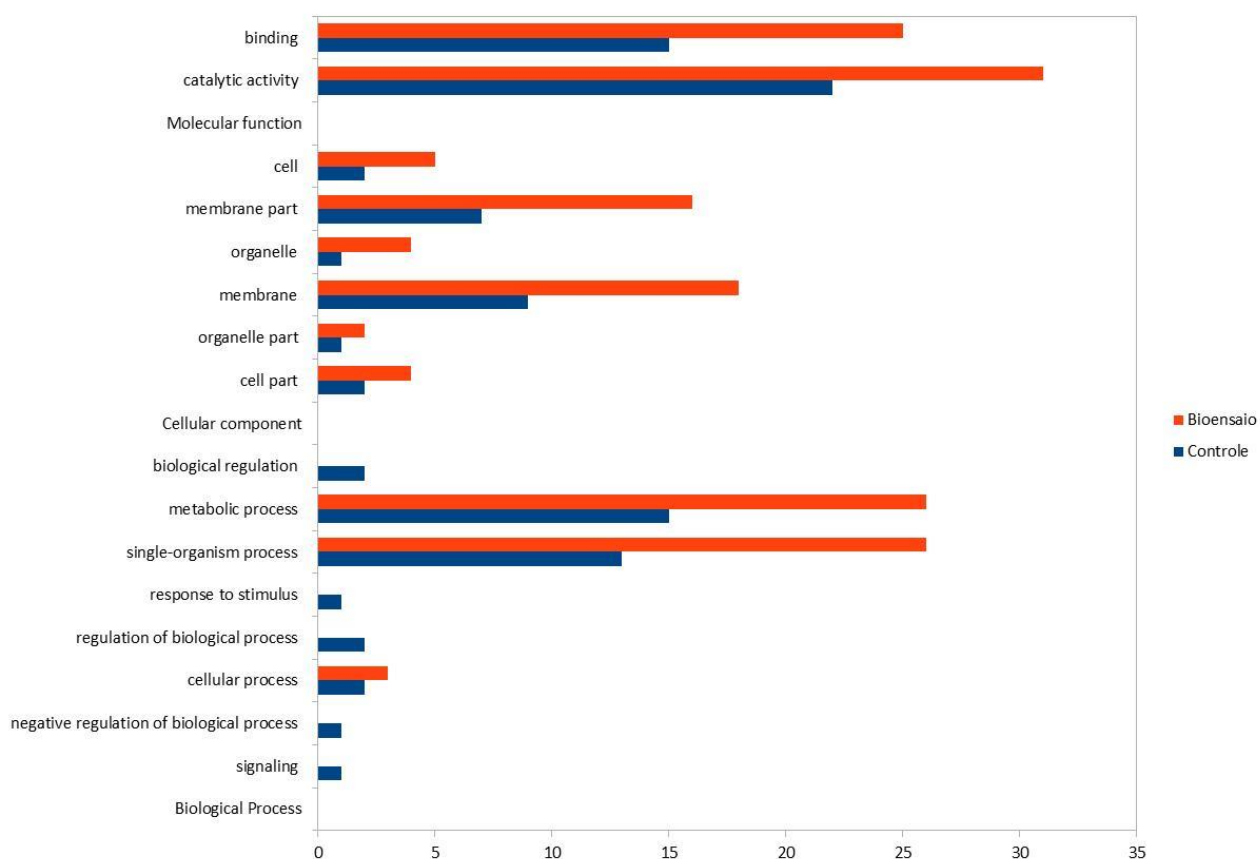


A Figura 35 apresenta a atribuição dos termos de Ontologia Gênica (categorização nas três principais ontologias: função molecular, componente celular e processo biológico) para as 54 enzimas, incluindo as do bioensaio e do controle. É possível observar que de modo geral, houve maior expressão das enzimas envolvidas nas diversas funções celulares para o bioensaio (em vermelho). Porém, para o bioensaio, na ontologia “processo biológico”, quatro subcategorias (regulação biológica, resposta a estímulos, regulação negativa do processo biológico e sinalização) apresentaram-se inexistentes (não expressas). Este resultado pode ser

um indicativo de que o metabolismo do consórcio no bioensaio está direcionado para outros processos, como o de degradação e destoxificação do poluente RBBR.

Conforme observado por Hong et al. (2016), em seu estudo de degradação de petróleo pela bactéria *Achromobacter* sp. HZ01, na anotação total do transcriptoma a maioria dos unigenes estava representada na categoria “processo biológico”. Para “componente celular”, as subcategorias “célula” e “partes celulares” eram dominantes, o que não foi observado no presente trabalho. Na categoria “função molecular”, as subcategorias mais representativas foram “ligação”, “catalítica” (assim como no presente trabalho), além de “transporte” e “regulador transcricional”. Para “processo biológico”, as subcategorias “processo celular” e “processo metabólico” foram as dominantes, sendo o mesmo observado para o processo metabólico no presente trabalho.

Figura 35. Distribuição dos termos Ontologia Gênica (GO): Função molecular, componente celular e processo biológico



4. CONCLUSÕES

A avaliação da destoxificação de poluentes ambientais por consórcios microbianos é uma abordagem interessante, que deve ser estimulada, tendo em vista a importância da redução ou eliminação da toxicidade desses compostos. Para tanto, os bioindicadores utilizados devem ser adequados. No presente estudo tanto a bactéria *Vibrio fischeri* quanto o microcrustáceo *Artemia* sp. apresentaram resultados satisfatórios na avaliação da toxicidade dos poluentes ambientais em condições salinas.

O consórcio 3 selecionado como o melhor destoxicador dos poluentes RBBR e óleo diesel apresentava em sua constituição dois fungos filamentosos e duas bactérias pertencentes a diferentes Filos, indicando a importância da presença de diferentes metabolismos.

A otimização do processo de destoxificação/descoloração do corante RBBR, por meio de planejamentos experimentais, revelou a importância dessa abordagem estatística em processos de biorremediação.

A condição de cultivo validada para a destoxificação/descoloração do corante RBBR é bastante simples, sendo constituída apenas pelos inóculos (4 cilindros de 0,5 cm de cada fungo e 4 mL de cada bactéria), 1 g/50mL de farelo de trigo, 100 % (v/v) de água do mar artificial e pH 8, indicando exequibilidade do processo. Em adição, a condição de salinidade e elevado valor de pH são próximas às condições reais dos efluentes têxteis, os quais, em sua maioria, apresentam salinidade e alcalinidade.

A adsorção do corante pelo farelo de trigo + biomassa microbiana, indicou que o farelo de trigo é um possível material adsorvente de corantes têxteis, o qual pode ser utilizado como alternativa no tratamento da remoção da cor. Apesar da alta porcentagem de adsorção do corante, as análises de FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) mostraram diferenças nos padrões de banda entre o corante têxtil, o bioensaio e o meio de cultivo otimizado (controle). Esses resultados, juntamente com os dados visuais de coloração do bioensaio (esverdeada) e do controle (azul), indicam que a remoção do corante do meio, foi obtida pela ação conjunta do metabolismo microbiano e da adsorção do corante pelo farelo de trigo.

As análises dos metatranscriptomas do consórcio 3, nas condições validadas (bioensaio e controle), confirmaram a atuação dos micro-organismos na destoxificação, degradação e descoloração do RBBR, tendo em vista a expressão de enzimas relacionadas com a degradação de alcanos e compostos aromáticos, produzidas apenas na presença do corante. Foi verificada a expressão de oito enzimas no bioensaio e de três enzimas no controle, possivelmente relacionadas com a degradação do corante, com destaque para dioxigenase e mono-oxigenases (bioensaio). Com exceção das enzimas do sistema citocromo P450 e epóxido hidrolases, a maioria das enzimas que foram expressas são produzidas, principalmente, por bactérias, indicando o papel importante desses micro-organismos na degradação do RBBR.

A conclusão das análises da anotação total dos metatranscriptomas (bioensaio e controle) poderá auxiliar na elucidação dos mecanismos de destoxificação/degradação do corante RBBR, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre esta temática, tendo em vista a escassez de estudos reportados em literatura com micro-organismos de origem marinha e de aplicação de análises de metatranscriptoma na degradação de corantes e de outros poluentes ambientais.

REFERÊNCIAS

- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 997–1026, mar. 2005.
- ALMEIDA, E. J. R.; CORSO, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, v. 112, p. 317–322, out. 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7–8, p. 602–605, 7 maio 2001.
- BALLANTYNE, K. N.; VAN OORSCHOT, R. A.; MITCHELL, R. J. Reduce optimisation time and effort: Taguchi experimental design methods. **Progress in Forensic Genetics 12 Proceedings of the 22nd International ISFG Congress**, v. 1, n. 1, p. 7–8, ago. 2008.
- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005.
- BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Metaproteomics of soils from semiarid environment: functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 31–42, 2014.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **Biodeterioration Problems of Industrial Concern, Part I**, v. 47, n. 2, p. 107–112, mar. 2001.
- BIROLI, W. G. et al. Biodegradation of the Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate by Marine-Derived Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 511–520, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32–37, 7 jan. 2010.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114, n. 10, p. 863–872, out. 2010.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1007–1019, 2000.

BOUHAJJA, E.; AGATHOS, S. N.; GEORGE, I. F. Metagenomics: Probing pollutant fate in natural and engineered ecosystems. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1413–1426, dez. 2016.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 1, p. 143–163, 2004.

BULICH, A. A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. **Process Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 45–47, 1992.

BUSTOS-OBREGON, E.; VARGAS, Á. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biological Research**, v. 43, p. 357–362, 2010.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus)* edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 15 abr. 1995.

CAPOTORTI, G. et al. Pyrene and benzo (a) pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. **Biodegradation**, v. 15, n. 2, p. 79–85, 2004.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, n. 2–3, p. 351–368, 1992.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 324–333, 1997.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. **Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi**. . In: BRITISH MYCOLOGICAL SOCIETY SYMPOSIUM SERIES. 2001

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). . **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 2079–2110.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 15 set. 2005.

DA SILVA, M. et al. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, n. 12, p. 1331–1339, 1 dez. 2008.

DANIELOPOL, D. L. et al. Present state and future prospects for groundwater ecosystems. **Environmental Conservation**, v. 30, n. 2, p. 104–130, 1 jun. 2003.

DASH, H. R. et al. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 561–571, 2013.

DE MENEZES, A.; CLIPSON, N.; DOYLE, E. Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2577–2588, 1 set. 2012.

DE QUEIROZ BAPTISTA, N. M. et al. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, 2012.

DE VASCONCELLOS, S. P. et al. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. **Organic Geochemistry**, v. 40, n. 5, p. 574–588, maio 2009.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n. 1–2, p. 191–200, 15 dez. 2014.

DELLAGNEZZE, B. M. et al. Bioaugmentation strategy employing a microbial consortium immobilized in chitosan beads for oil degradation in mesocosm scale. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 1, p. 107–117, 15 jun. 2016.

DENIZ, F. Optimization of Biosorptive Removal of Dye from Aqueous System by Cone Shell of Calabrian Pine. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

DOYLE, J. E.; MCMAHON, B. R. Effects of acid exposure in the brine shrimp *Artemia franciscana* during development in seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 112, n. 1, p. 123–129, 1 set. 1995.

D'SOUZA, D. T. et al. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3, p. 504–511, 2006.

DUARTE, L. A. Destoxificação de petróleo e óleo diesel por consórcios microbianos de origem marinha. Rio Claro, 2016. Dissertação de mestrado, 96f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.

EL-ALAWI, Y. S. et al. Quantitative structure-activity relationship for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 2225–2232, 1 out. 2002.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1 mar. 1998.

FAT'HI, M. R. et al. Kinetics and thermodynamic studies for removal of acid blue 129 from aqueous solution by almond shell. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 62, 2014.

FERRARONI, M. et al. Crystal Structure of 4-Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase from the Chlorophenol-utilizing Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27646–27655, 25 jun. 2004.

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

GAN, S.; LAU, E. V.; NG, H. K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 532–549, 30 dez. 2009.

GANEY, P. E.; BOYD, S. A. An Approach to Evaluation of the Effect of Bioremediation on Biological Activity of Environmental Contaminants: Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 180–185, fev. 2005.

GARRIDO-BAZÁN, V. et al. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 93, 2016.

GILBERT, J. A. et al. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. **PLoS One**, v. 3, 2008.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, n. 1, p. 2–29, 4 fev. 2008.

GÖNEN, F.; AKSU, Z. Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: Use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 1512–1519, 30 dez. 2009.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, jul. 2011.

HADIBARATA, T.; YUSOFF, A. R. M.; KRISTANTI, R. A. Decolorization and Metabolism of Anthraquinone-Type Dye by Laccase of White-Rot Fungi *Polyporus* sp. S133. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 2, p. 933–941, 2012.

HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. e131–e131, jul. 2010.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1–3, p. 1–15, 30 set. 2009.

HARMENS, H. et al. Terrestrial mosses as biomonitors of atmospheric POPs pollution: A review. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 245–254, fev. 2013.

HONG, Y.-H. et al. Characterization of the transcriptome of *Achromobacter* sp. HZ01 with the outstanding hydrocarbon-degrading ability. **Gene**, v. 584, n. 2, p. 185–194, 15 jun. 2016.

HUGHES, J. et al. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 2–3, p. 152–160, 1997.

JACOBS, M. W. et al. Comparison of sediment extract Microtox® toxicity with semi-volatile organic priority pollutant concentrations. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 461–468, 1993.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127–141, jan. 2009.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Process optimization for efficient dye removal by *Aspergillus lentulus* FJ172995. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 837–843, 30 jan. 2011.

KEITH, L.; TELLIARD, W. ES&T special report: priority pollutants: la perspective view. **Environmental Science & Technology**, v. 13, n. 4, p. 416–423, 1979.

KESTER, D. R. et al. Preparation of artificial seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 12, n. 1, p. 176–179, 1967.

KHAN, N. A.; HASAN, Z.; JHUNG, S. H. Adsorptive removal of hazardous materials using metal-organic frameworks (MOFs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 444–456, 15 jan. 2013.

KIM, K.-H. et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v. 60, p. 71–80, out. 2013.

KRIVOSHTO, I. N. et al. The toxicity of diesel exhaust: implications for primary care. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 21, n. 1, p. 55–62, 2008.

KUMAR, A. et al. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1079, 2011.

KUNJADIA, P. D. et al. Role of ligninolytic enzymes of white rot fungi (*Pleurotus* spp.) grown with azo dyes. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1487, 2016.

KURÁŇ, P. et al. Biodegradation of spilled diesel fuel in agricultural soil: effect of humates, zeolite, and bioaugmentation. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305–315, set. 1990.

LEME, C. R. Aplicação de consórcio microbiano marinho na destoxificação do contaminante pireno. Rio Claro, 2016. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental), 54f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016.

LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; VIALE, A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes troglia*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1381–1387, mar. 2005.

LIU, S.-H. et al. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. **Bioresource Technology**, 2016.

LIU, Y. et al. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Huangpu River, Shanghai, China. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 8, p. 2931–2938, 1 abr. 2009.

LU, R. et al. White-rot fungus *Ganoderma* sp.En3 had a strong ability to decolorize and tolerate the anthraquinone, indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 3, p. 381–390, 2016.

LUZ, C. C. et al. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho - RO, Amazônia. **Química Nova**, v. 34, p. 775–779, 2011.

MAGRINI, M.J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. Campinas, 2012. Dissertação de mestrado, 91f. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *Peniophora* sp . CBMAI 1063 em biorreator de bancada. Rio Claro, 2015. Dissertação de mestrado, 65f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

MILHEM, M. M.; AL-HIYASAT, A. S.; DARMANI, H. Toxicity testing of restorative dental materials using brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 4, p. 297–301, 2008.

MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1075–1082, 2009.

OBEROI, A. S.; PHILIP, L. Variation in toxicity during the biodegradation of various heterocyclic and homocyclic aromatic hydrocarbons in single and multi-substrate systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 337–346, jan. 2017.

OLLIS, D. L. et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1 abr. 1992.

PARRO, V.; PAZ, M. M. Metatranscriptome. In: AMILS, R. et al. (Eds.). **Encyclopedia of Astrobiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 1–3.

PASSARINI, M. R.; SETTE, L. D.; RODRIGUES, M. V. Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 3, p. 564–570, 2011.

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

PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, p. 19, 2015.

PATROLECCO, L. et al. Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). **Chemosphere**, v. 81, n. 11, p. 1386–1392, dez. 2010.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PORETSKY, R. S. et al. Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1358–1375, 2009.

PORETSKY, R. S. et al. Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 616–627, 2010.

RADAEI, E.; ALAVI MOGHADDAM, M. R.; ARAMI, M. Removal of reactive blue 19 from aqueous solution by pomegranate residual-based activated carbon: optimization by response surface methodology. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 65, 2014.

- RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.
- RODRIGUES, C. S. D.; MADEIRA, L. M.; BOAVENTURA, R. A. R. Optimization of the azo dye Procion Red H-EXL degradation by Fenton's reagent using experimental design. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 987–994, 30 maio 2009.
- RODRIGUES, M.; IEMMA, A. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2^a. **Campinas**, 2009.
- SALEEM, M. et al. Marine natural products of fungal origin. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 5, p. 1142–1152, 2007.
- SHENG, D.; BALLOU, D. P.; MASSEY, V. Mechanistic Studies of Cyclohexanone Monooxygenase: Chemical Properties of Intermediates Involved in Catalysis. **Biochemistry**, v. 40, n. 37, p. 11156–11167, 1 set. 2001.
- SHUIB, F. N. S. et al. Optimization of Physiochemical Parameters during Bioremediation of Synthetic Dye by *Marasmius cladophyllus* UMAS MS8 Using Statistical Approach. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 8296239, 2016.
- SHUTTLEWORTH, K. L.; CERNIGLIA, E. Environmental aspects of PAH biodegradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 291–302, 1995.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.
- SINGH, R. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1, 2014.
- SINGH, Z.; CHADHA, P. Textile industry and occupational cancer. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 39, 2016.
- SU, P.; ZHU, H.; SHEN, Z. QSAR models for removal rates of organic pollutants adsorbed by in situ formed manganese dioxide under acid condition. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3609–3620, 2016.
- SURGET-GROBA, Y.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Optimization of *de novo* transcriptome assembly from next-generation sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 10, p. 1432–1440, 2010.
- TÁNCICS, A. et al. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 1–7, fev. 2015.
- TRIPATHY, S. et al. Analysis of the metatranscriptome of microbial communities of an alkaline hot sulfur spring revealed different gene encoding pathway enzymes associated with energy metabolism. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 525–536, 2016.

VASCONCELOS, M.R.S. Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais. São Paulo, 2015. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.

VASCONCELLOS, S. P. et al. The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1513–1518, 2011.

VIDALI, M. Bioremediation. an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VITALI, V. M. V. et al. Screening mitosporic fungi for organochlorides degradation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 256–261, 2006.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, 25 nov. 1992.

WARNECKE, F.; HESS, M. A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 91–95, 2009.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2001.

ZEIKUS, J. G. The biology of methanogenic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 514–541, jun. 1977.

ZINDER, S. H. et al. Methanogenesis in a Thermophilic (58°C) Anaerobic Digester: *Methanothrix* sp. as an Important Aceticlastic Methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796–807, abr. 1984.

ANEXOS

ANEXO 1. Matriz Codificada Plackett-Burman para 20 ensaios (PB1).

Ensaio	1 Inóculo fúngico (cilindros de 0,5 cm)	2 Inóculo Bacteriano (mL)	3 Glicose (g)	4 Extrato de levedura (g)	5 Peptona (g)	6 Extrato de malte (g)	7 Farelo de trigo (g)	8 Serragem (g)	9 CuSO ₄ (mM)	10 Guaiacol (mM)	11 Corante (ppm)	12 pH	13 Salinidade (ASW %)
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
21 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

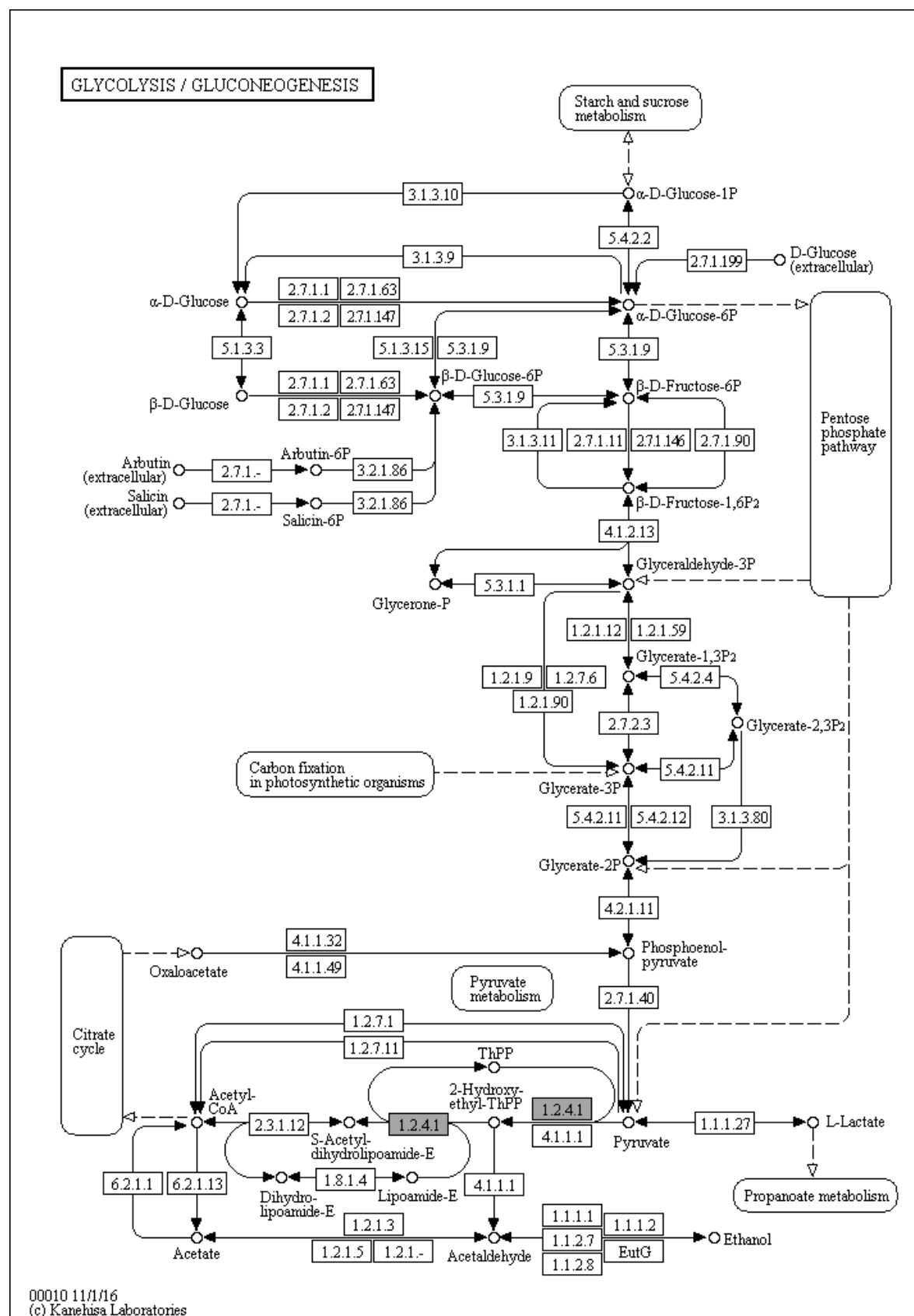
ANEXO 2. Matriz Codificada Plackett-Burman para 16 ensaios (PB2).

Ensaio	1 Inóculo fúngico (cilindros de 0,5 cm)	2 Inóculo bacteriano (mL/50mL)	3 Extrato de levedura (g/50mL)	4 Peptona (g/50mL)	5 Extrato de malte (g/50mL)	6 Farelo de trigo (g/50mL)	7 Guaiacol (mM/50mL)	8 Corante (ppm)	9 pH
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

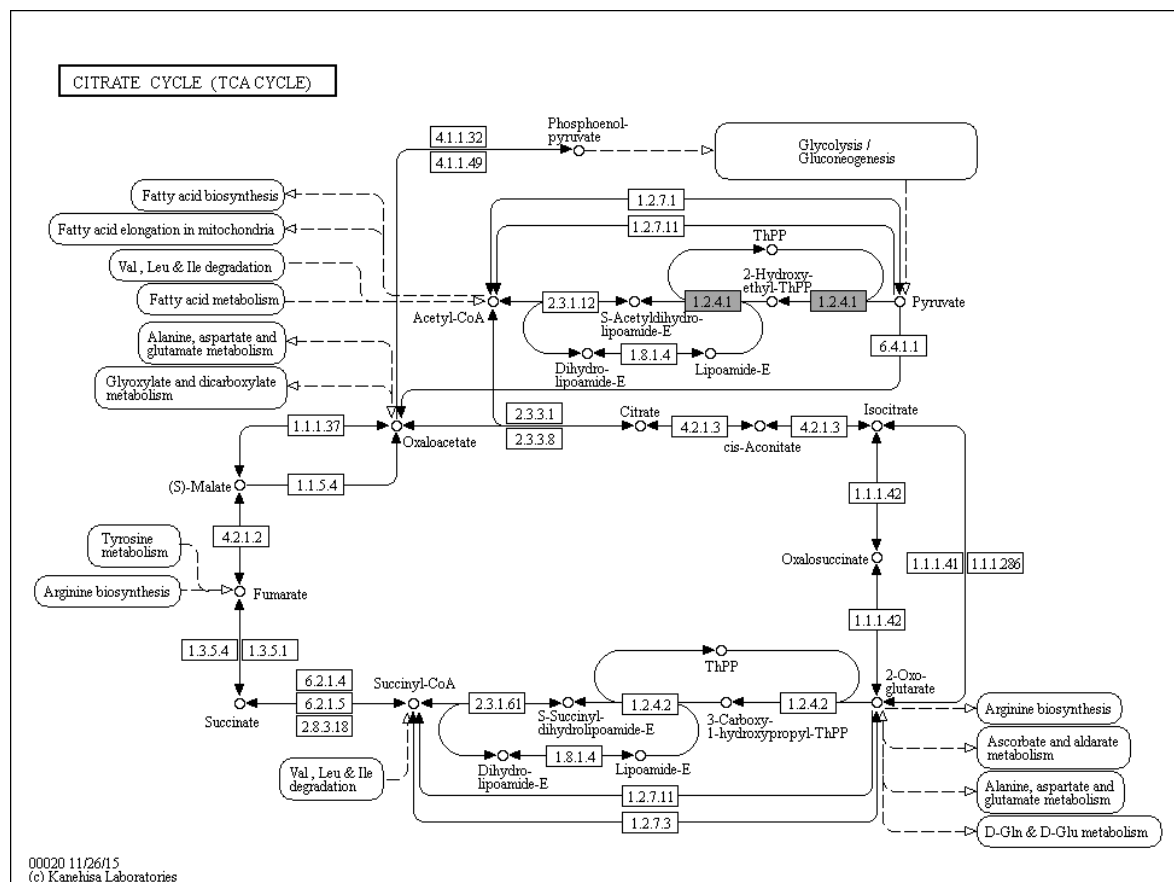
ANEXO 3. Matriz Codificada de DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com 8 ensaios

Ensaio	Farelo de trigo (g/50mL)	Corante (ppm)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

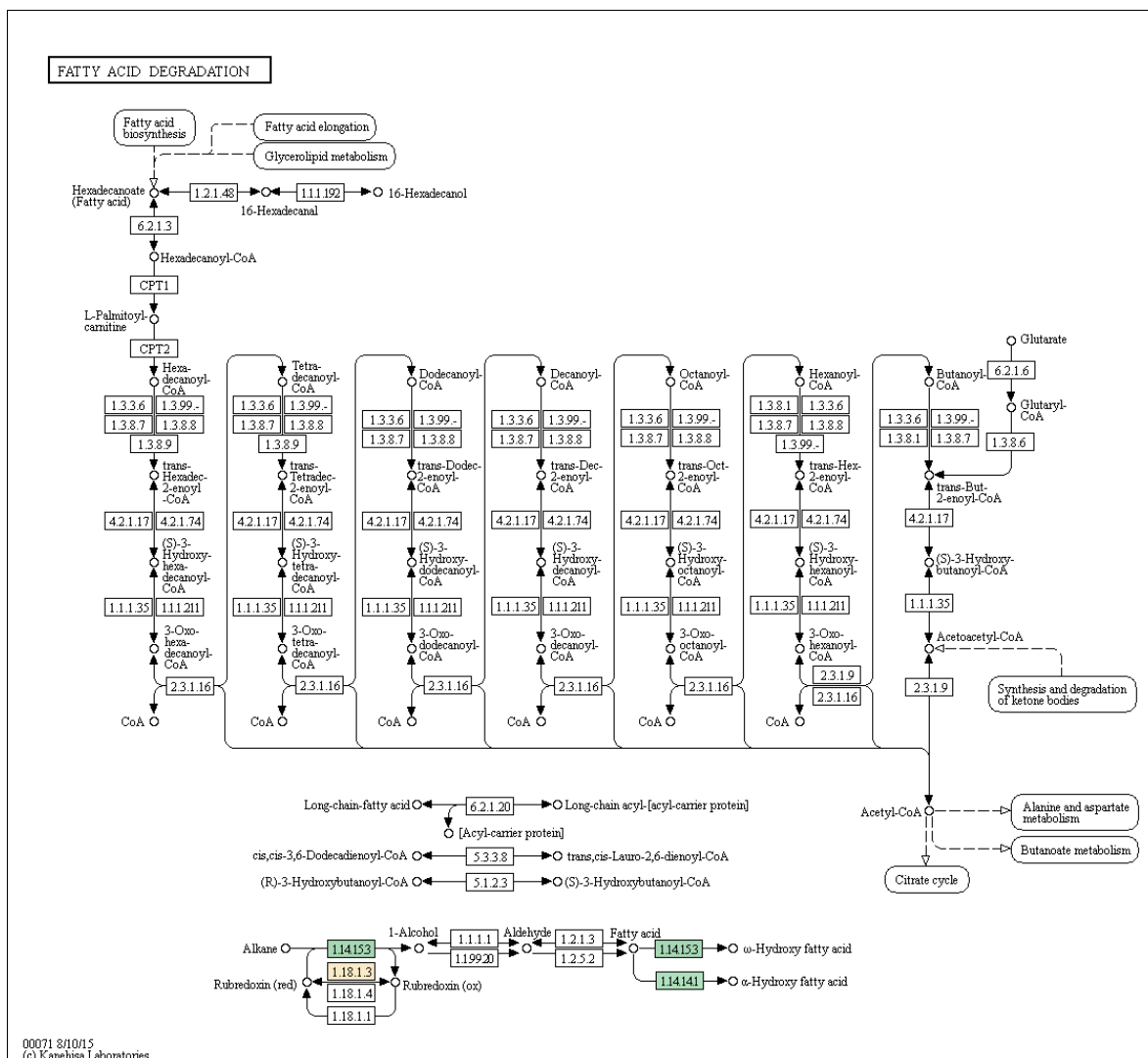
ANEXO 4 – Rota metabólica da glicólise/ gliconeogênese (destaque EC 1.2.4.1) - BIOENSAIO



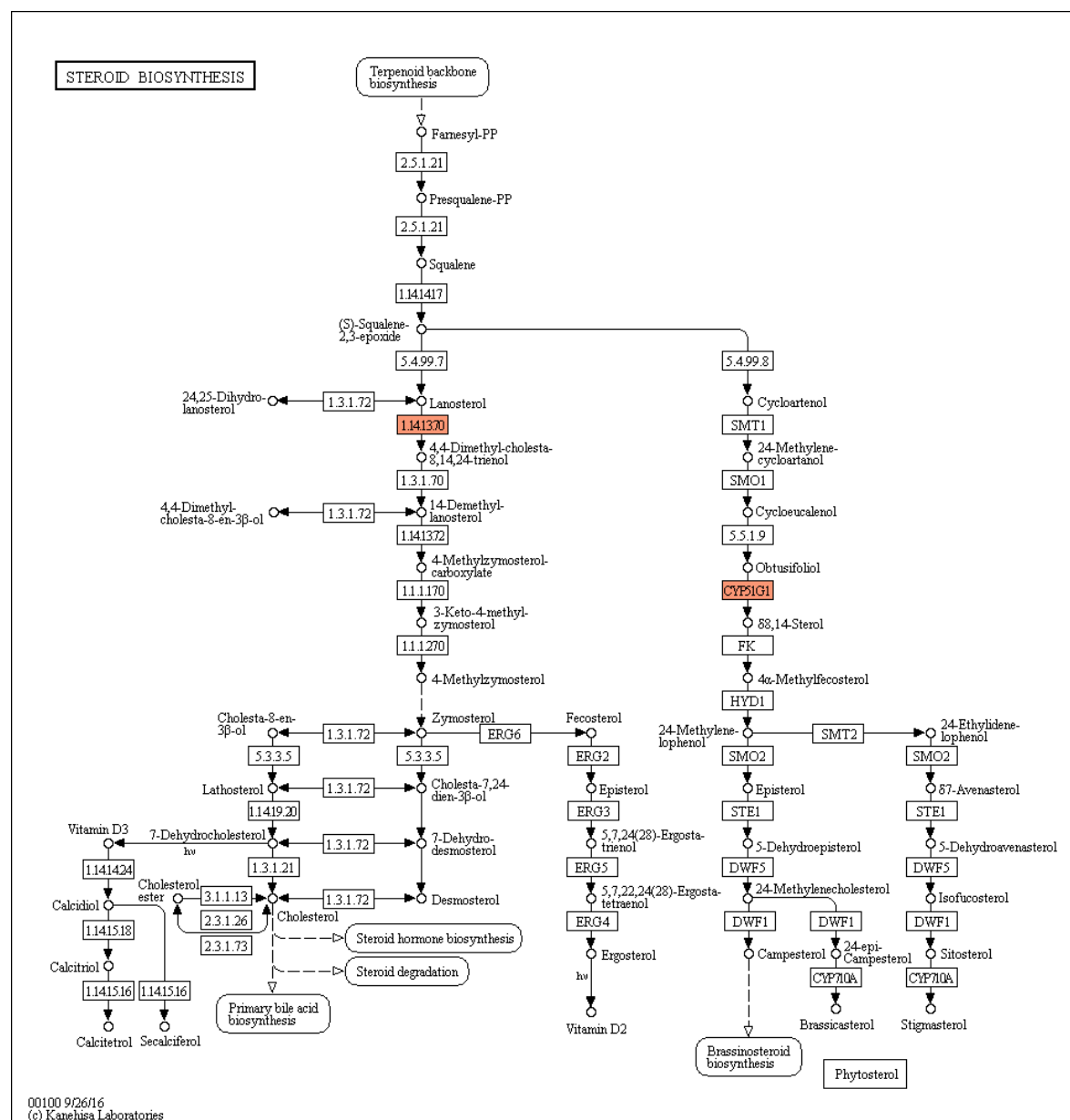
ANEXO 5 – Rota metabólica do ciclo do ácido cítrico (destaque EC 1.2.4.1) - BIOENSAIO

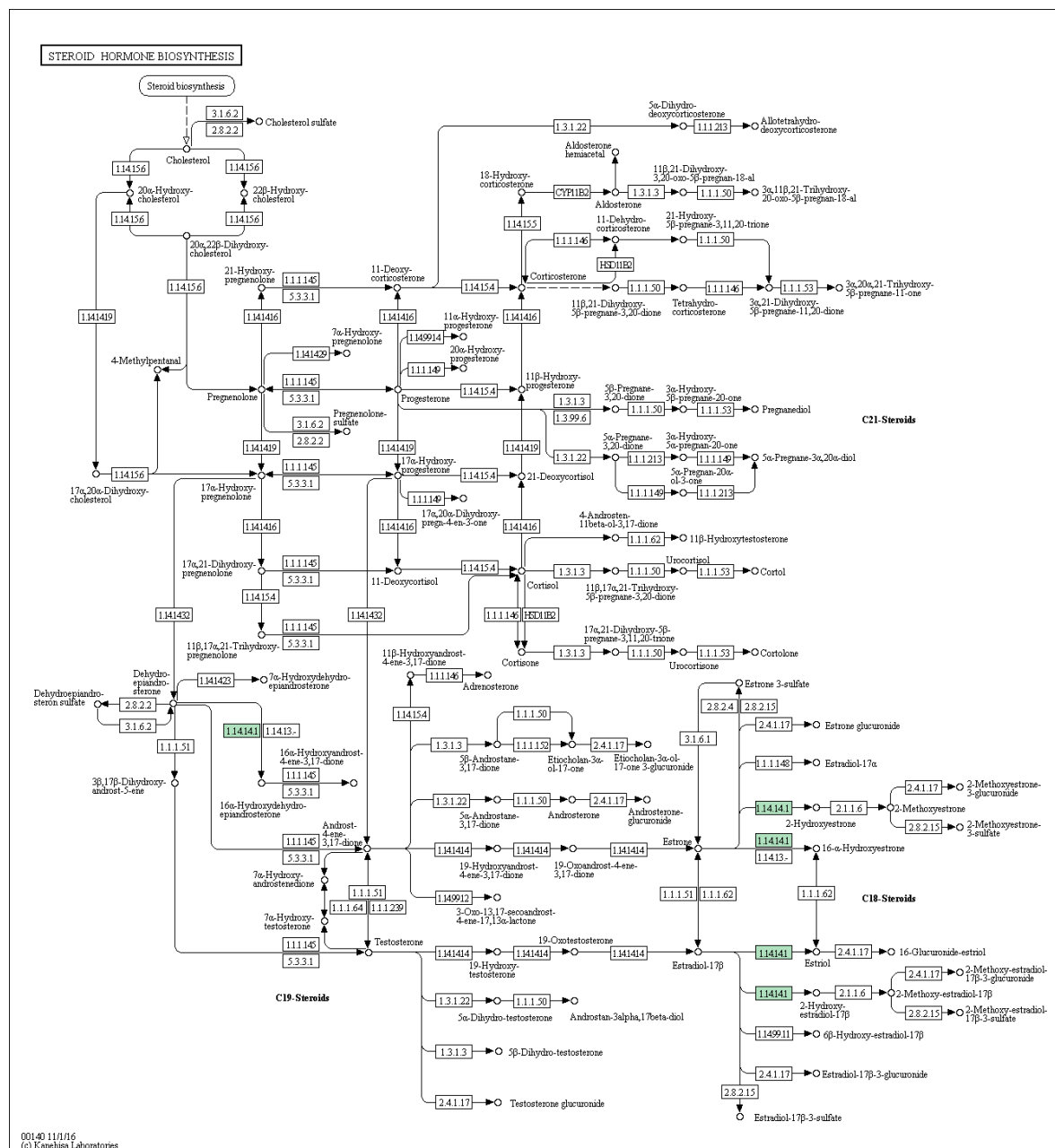


ANEXO 6 – Rota metabólica da degradação dos ácidos graxos (destaque EC 1.14.15.3 e 1.18.1.3) - BIOENSAIO

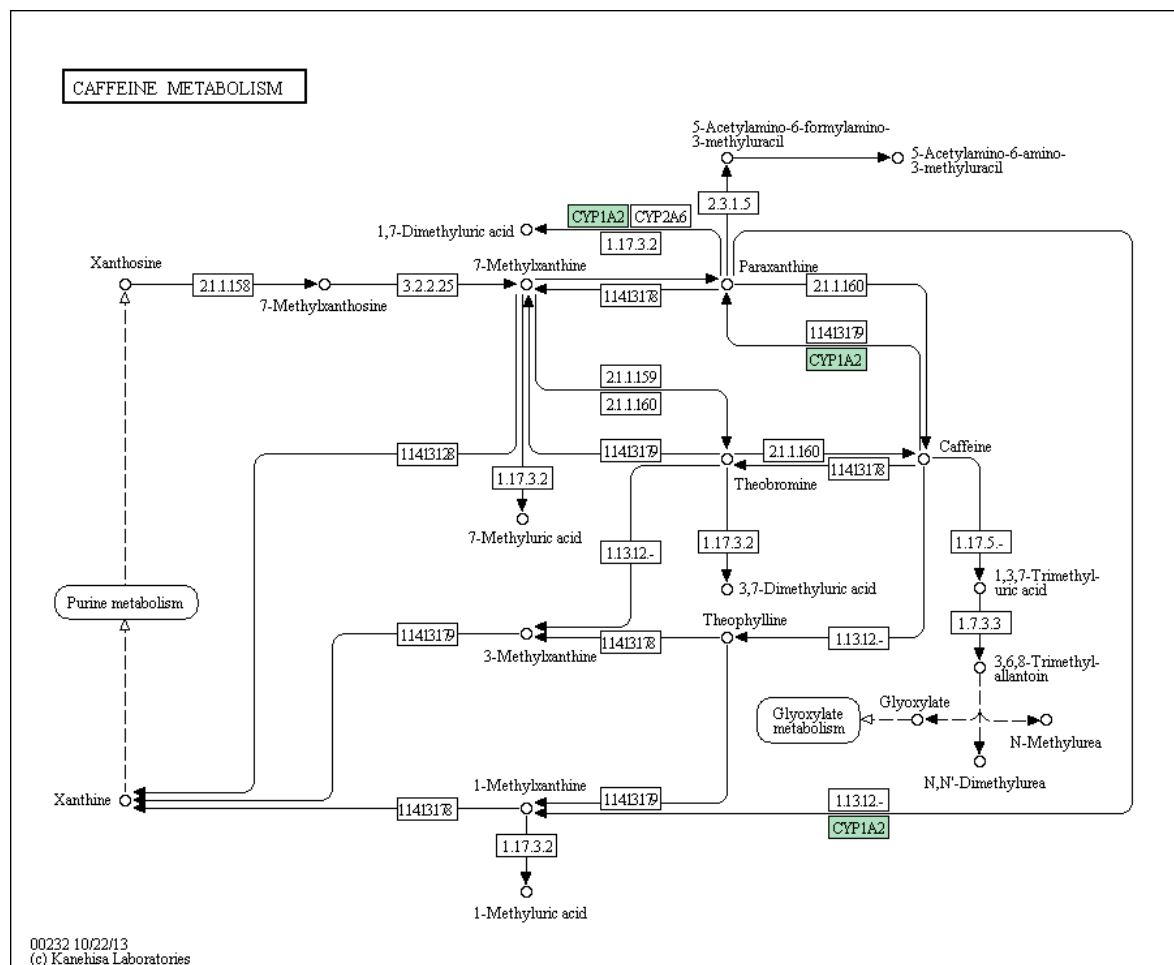


ANEXO 7 – Rota metabólica da biossíntese de esteroides (destaque EC 1.14.13.70) - BIOENSAIO

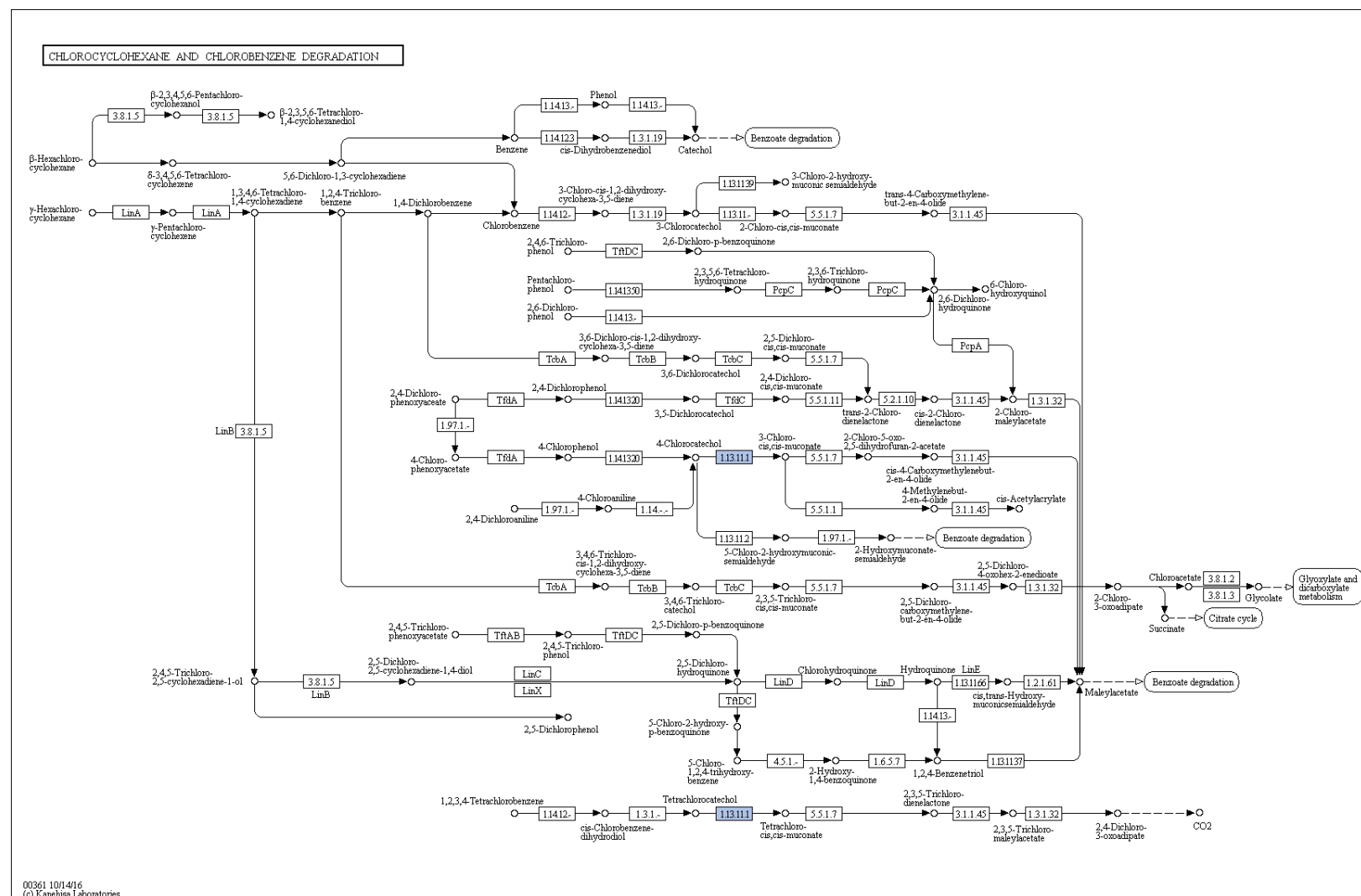




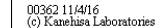
ANEXO 9 – Metabolismo da cafeína (destaque CYP1A2 - EC 1.14.14.1) - BIOENSAIO



ANEXO 10 – Rota metabólica da degradação do clorociclohexano e clorobenzeno (destaque - EC 1.13.11.1) - BIOENSAIO



ANEXO 11 – Rota metabólica da degradação do benzoato (destaque - EC 1.13.11.1) - BIOENSAIO



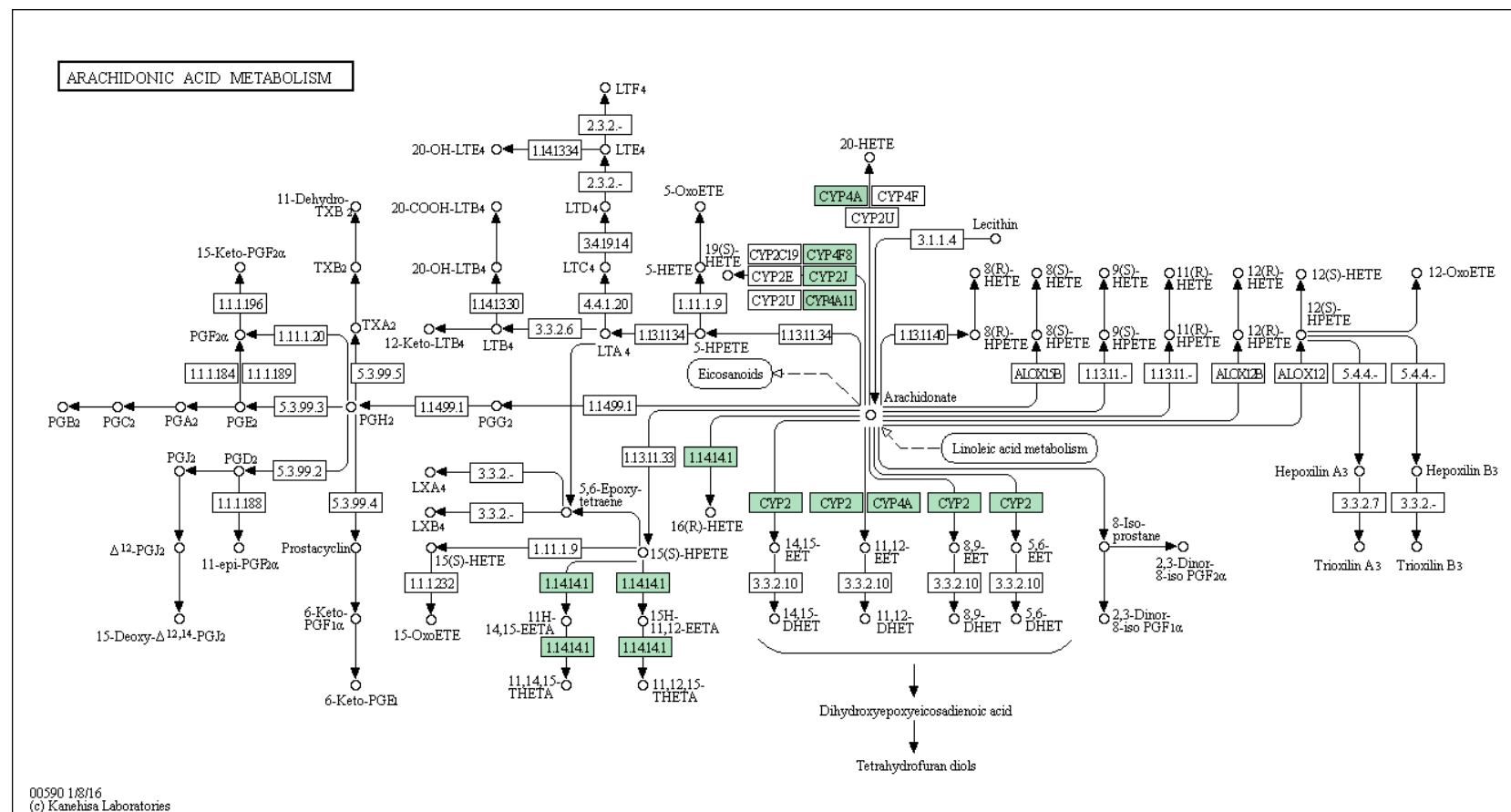
FLUOROBENZOATE DEGRADATION

The diagram illustrates the metabolic pathways for the degradation of fluorinated aromatic compounds. Key components include:

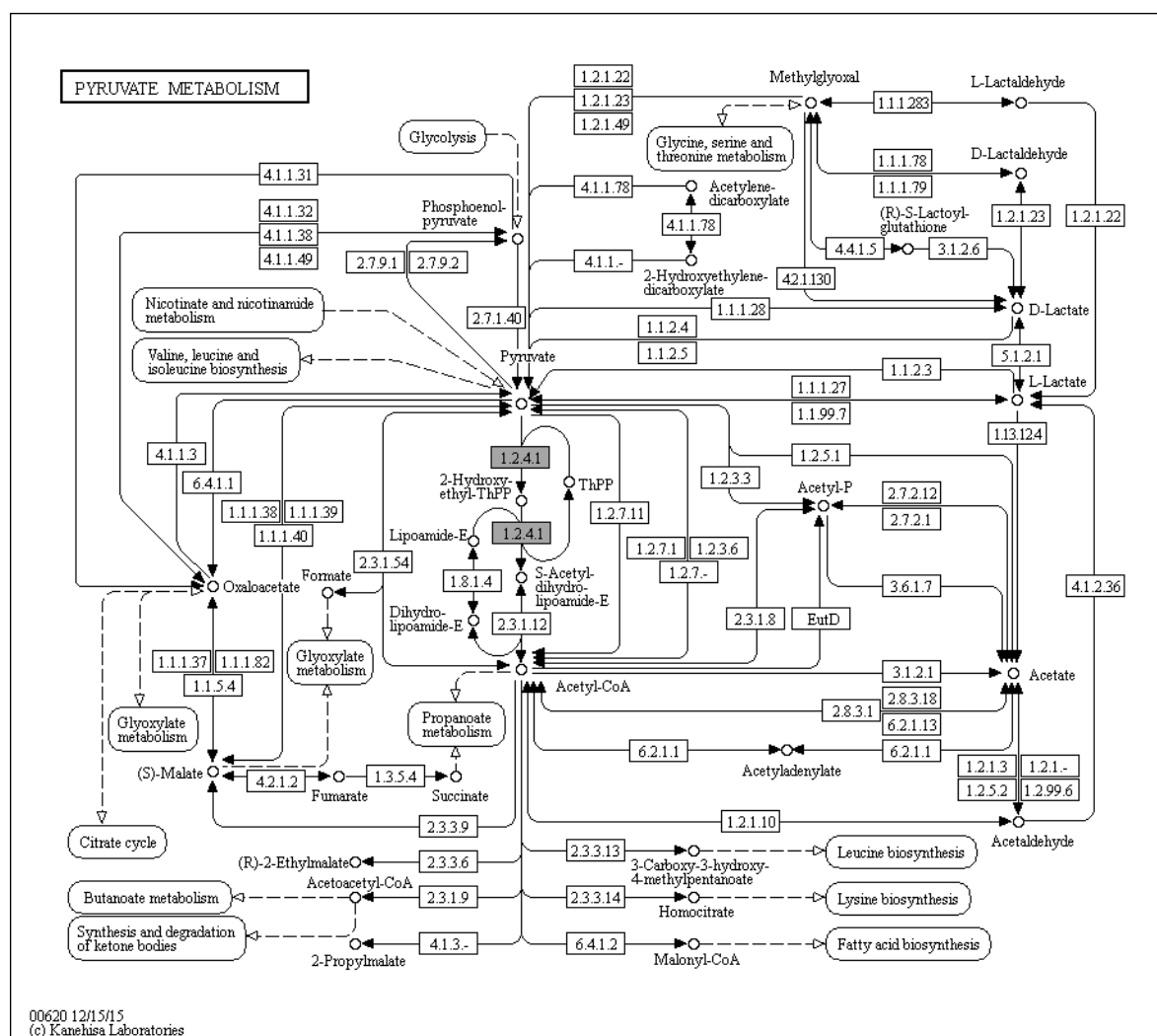
- Starting Compounds:** 2-Fluorobenzoate, 3-Fluorobenzoate, 4-Fluorobenzoate, Fluorobenzene, 4-Chlorobenzoate, 4-Fluorobenzoate, 4-Chloro-benzoyl-CoA, 2,4-Dichlorobenzoate.
- Enzymes (EC numbers in boxes):** 1.141210, 1.3.1.-, 1.141210, 1.3.1.25, 1.141210, 1.3.1.25, 1.141210, 1.3.1.25, 1.141210, 1.3.1.-, 1.141210, 1.3.1.-, 6.2.1.33, 3.8.1.7, 1.2.1.2, 6.2.1.-, 3.5.5.6, 4.2.1.84, 3.5.1.-, 1.141300, 5.5.1.7, 3.1.1.45, 1.3.1.32, 5.5.1.1, 3.1.1.45, 1.141213.
- Enzyme Names (in ovals):** 2-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate, 6-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate, 3-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate, 5-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate, 4-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol, 1-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol, 4-Chloro-benzoyl-CoA, 2,4-Dichlorobenzoate, DDT degradation, Dioxin degradation, Benzoate degradation, Bromoxynil, 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzamide, 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoate, 2,6-Dibromophenol, 2-Bromo-maleylacetate, 2,6-Dibromohydroquinone, 2-Fluoro-cis,cis-muconate, 5-Fluoromuconolactone, 3-Fluoro-cis,cis-muconate, 4-Fluoromuconolactone, Maleylacetate, Catechol.
- Pathway Flow:**
 - 2-Fluorobenzoate → 2-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate → 3-Fluorocatechol → 2-Fluoro-cis,cis-muconate → 5-Fluoromuconolactone → 3-Fluoro-cis,cis-muconate → 4-Fluoromuconolactone → Maleylacetate → Catechol.
 - 3-Fluorobenzoate → 3-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate → 4-Fluorocatechol → 3-Fluoro-cis,cis-muconate → 4-Fluoromuconolactone → Maleylacetate → Catechol.
 - 4-Fluorobenzoate → 4-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol-1-carboxylate → 4-Fluorocatechol → 3-Fluoro-cis,cis-muconate → 4-Fluoromuconolactone → Maleylacetate → Catechol.
 - Fluorobenzene → 4-Fluorocyclohexadiene-cis,cis-1,2-diol → 4-Fluorocatechol → 3-Fluoro-cis,cis-muconate → 4-Fluoromuconolactone → Maleylacetate → Catechol.
 - 4-Chlorobenzoate → 4-Chloro-benzoyl-CoA → 2,4-Dichlorobenzoate → Benzoate degradation → Catechol.
 - 4-Fluorobenzoate → 4-Fluorobenzoate → Benzoate degradation → Catechol.

[illegible]

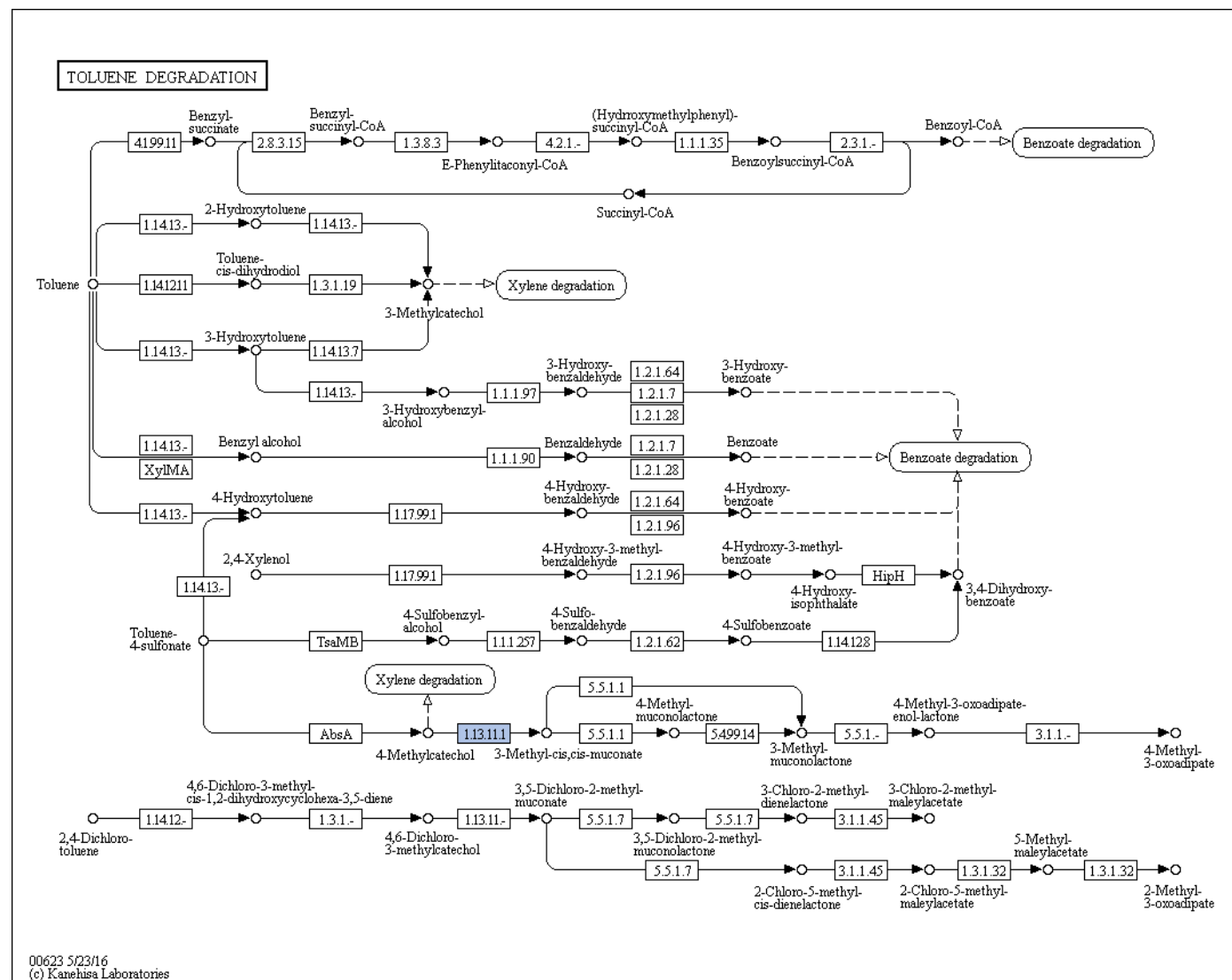
ANEXO 14 – Metabolismo do ácido aracdônico (destaque - EC 1.14.14.1) - BIOENSAIO



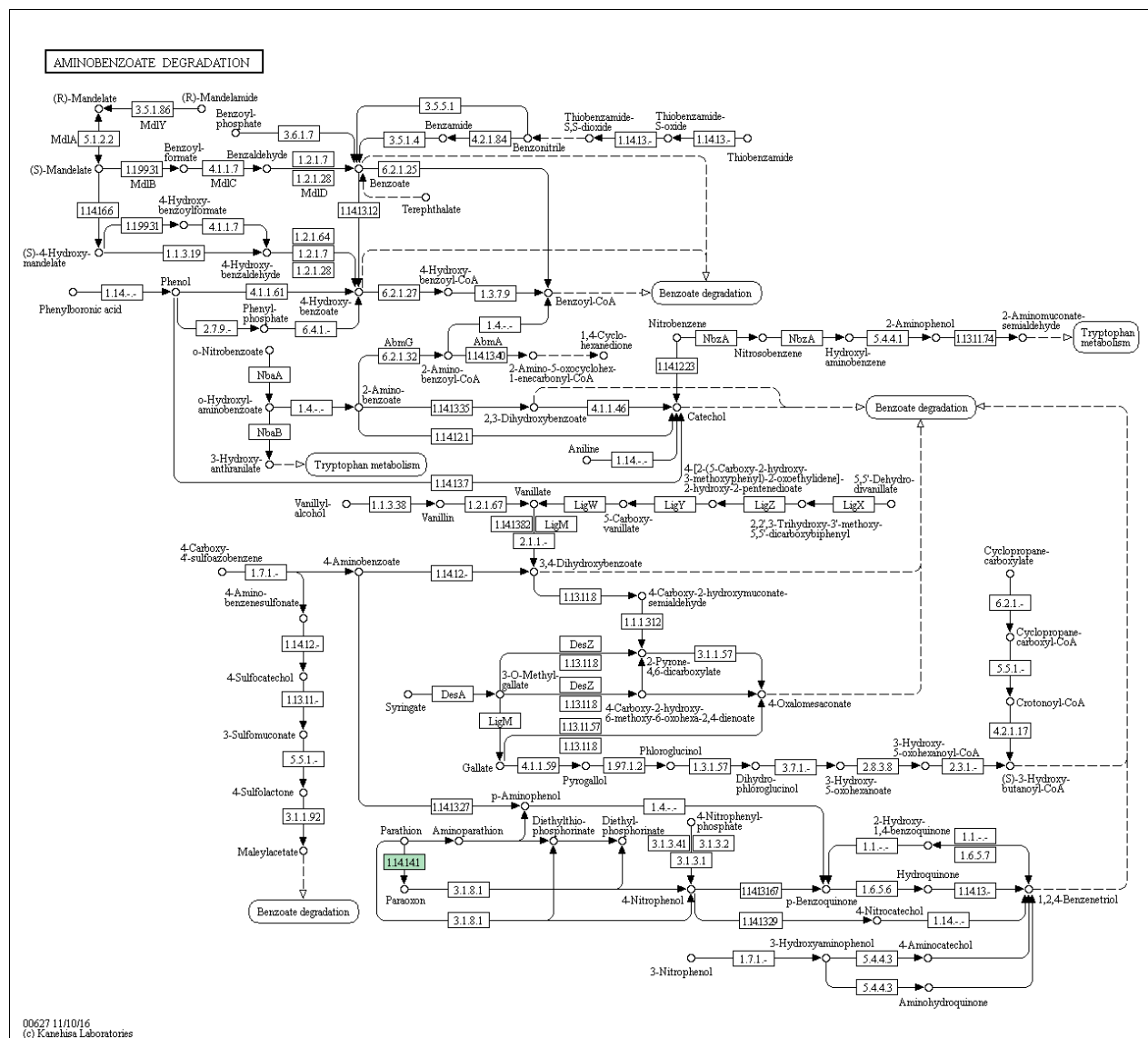
ANEXO 16 – Metabolismo do piruvato (destaque - EC 1.2.4.1) - BIOENSAIO

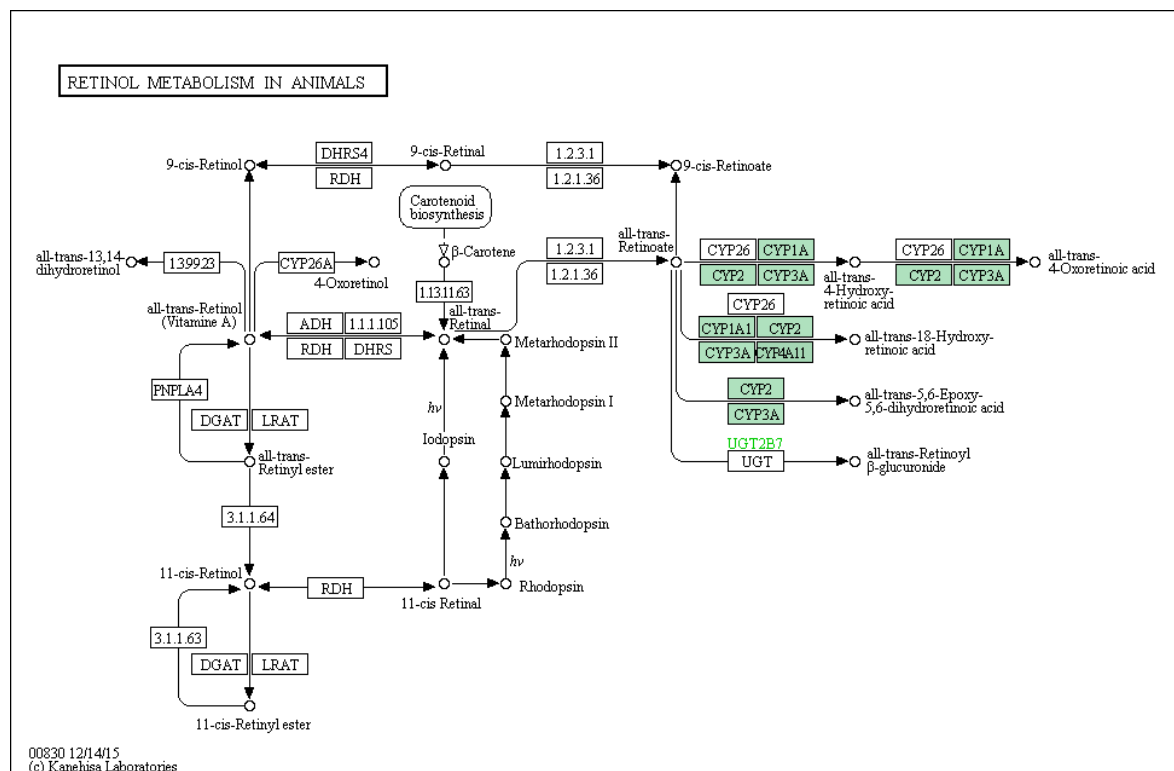


ANEXO 17 – Rota metabólica da degradação do tolueno (destaque - EC 1.13.11.1) - BIOENSAIO

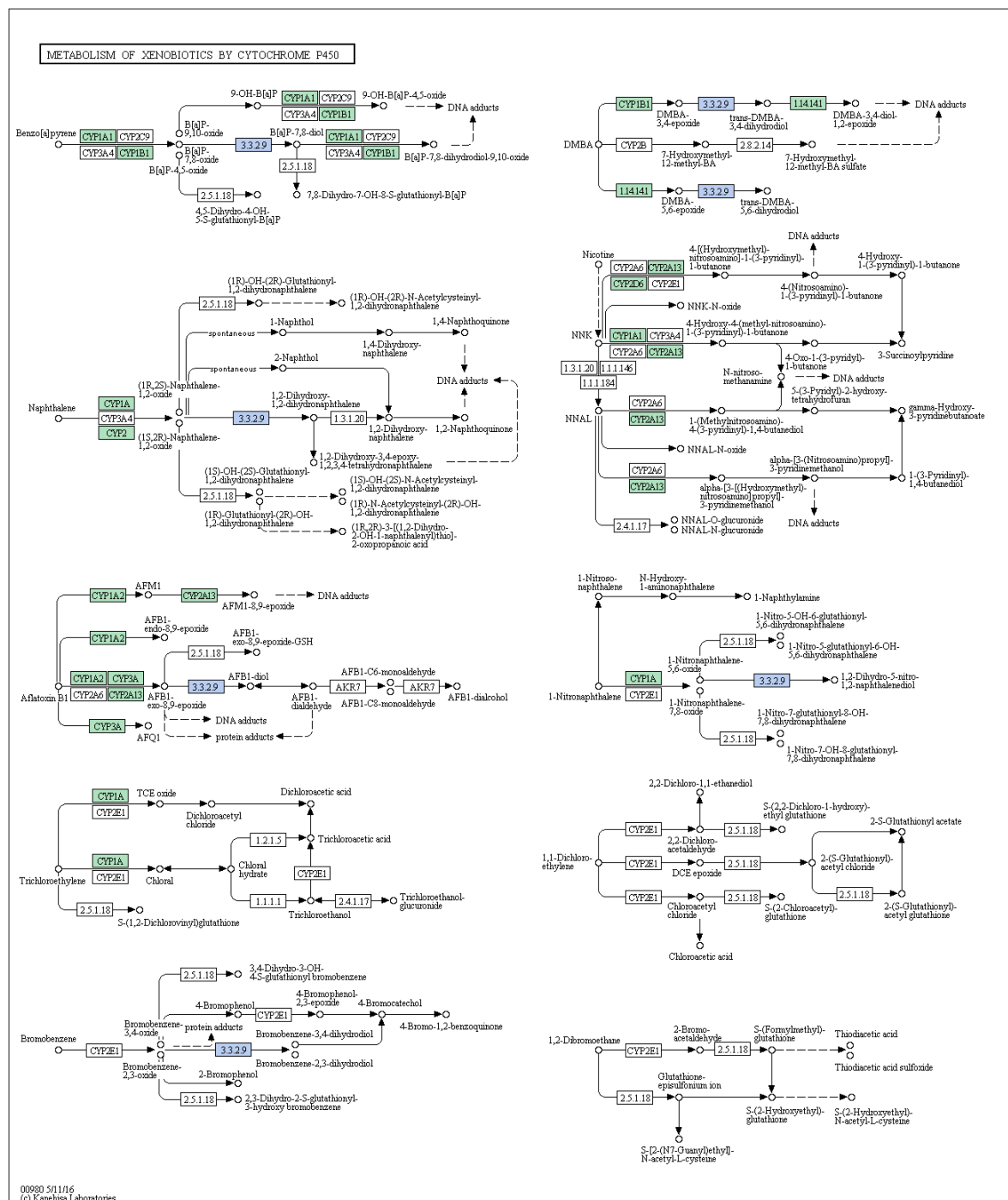


ANEXO 18 – Rota metabólica da degradação do aminobenzoato (destaque - EC 1.14.14.1) - BIOENSAIO



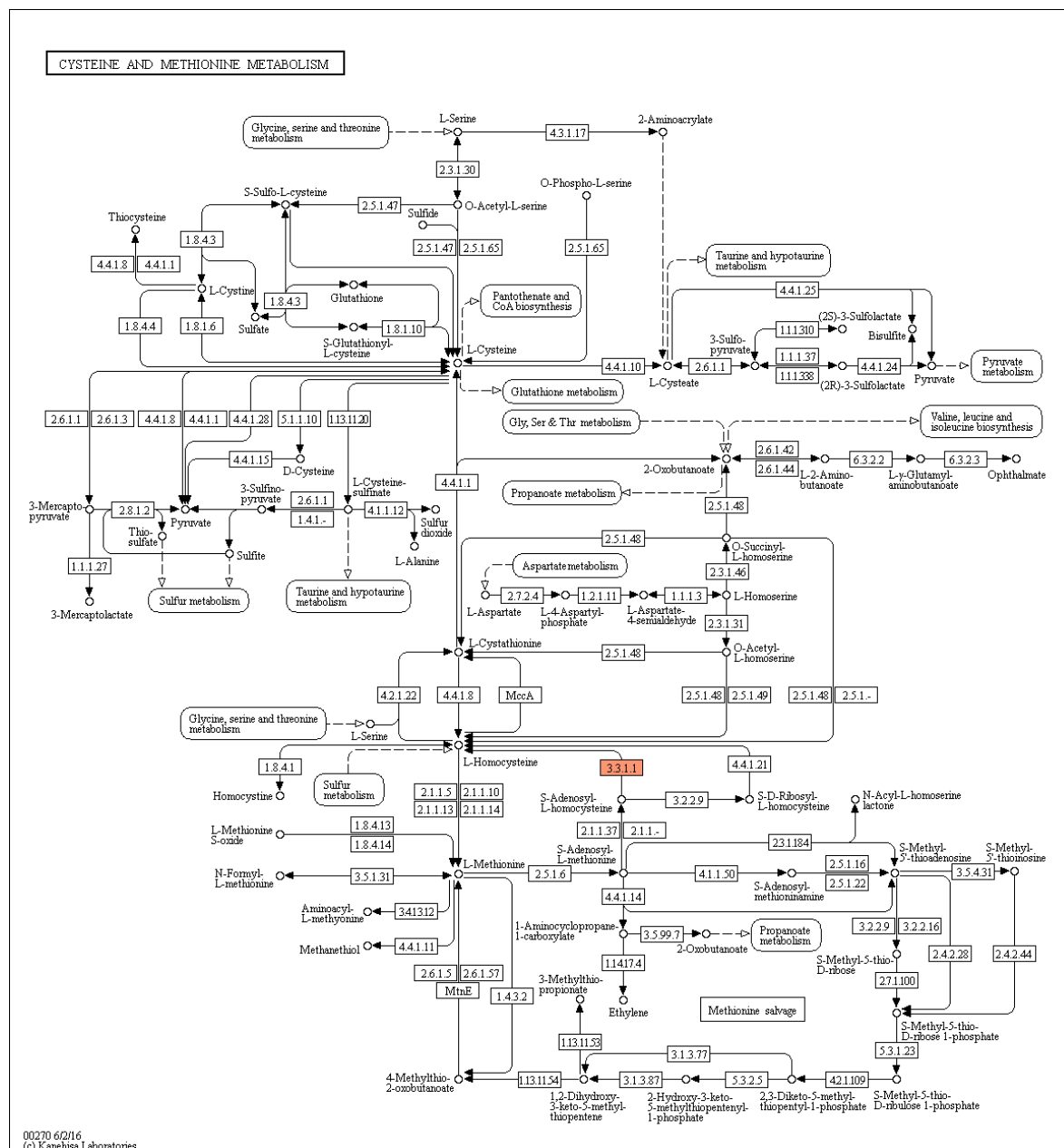


ANEXO 21 – Metabolismo de xenobióticos pela via da citocromo P450 (destaque - EC 3.3.2.9. e 1.14.14.1) - BIOENSAIO



[illegible]

ANEXO 23 – Metabolismo dos aminoácidos cisteína e metionina (destaque - EC 3.3.1.1) - CONTROLE



ANEXO 24 – Metabolismo de xenobióticos pela via da citocromo P450 (destaque - EC 3.3.2.9. e 1.14.14.1) - CONTROLE

