UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

DETOXIFICAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA

LÍDIA DE AZEVEDO DUARTE

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

Junho - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

DETOXIFICAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA

LÍDIA DE AZEVEDO DUARTE

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

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

Rio Claro
2016

620.1122 Duarte, Lídia de Azevedo
D812d Detoxificação de petróleo e óleo diesel por consórcios microbianos de origem marinha / Lídia de Azevedo Duarte. - Rio Claro, 2016
96 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Fungos marinhos. 4. Poluentes ambientais. 5. Testes de toxicidade. 6. Enzimas microbianas. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DETOXIFICAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA

AUTORA: LÍDIA DE AZEVEDO DUARTE
ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

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

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

Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas

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

Rio Claro, 20 de junho de 2016

TITULO ALTERADO PARA: "DETOXIFICAÇÃO DE PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS DE ORIGEM MARINHA"

Dedico este trabalho às minhas raízes:

àquelas que me inquietam e me fazem encontrar o caminho

e àquelas que me dão oportunidade de percorrê-lo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Thelma e Marcos, e aos meus avós Ivan, Antonieta, Augusto e Therezinha, por todo amor dedicado durante toda minha vida, esforço e educação responsáveis pela minha construção enquanto ser humano e profissional.

Aos meus irmãos, Thiago e Marina, pelo amor ímpar, companheirismo e apoio durante toda a vida.

Ao meu namorado, amigo, parceiro e irmão de alma, Rafael, pelo apoio e presença em todos os momentos, preenchendo e agregando minha vida da maneira mais perfeita possível. Minha sincera gratidão não só pela ajuda direta neste trabalho, mas pela felicidade e o amor que construímos juntos diariamente.

Aos meus tios, Marta e Alexandre, pela presença inabalável em todos os momentos que precisei e pelo amor transmitido durante toda minha vida. Agradeço em especial o apoio dado durante a parte do trabalho realizado no CPQBA/UNICAMP, pela estadia, alimentação, troca de conhecimentos e sugestões para enriquecimento do trabalho, fornecidos de forma tão altruísta e amorosa. Além disso, deixo aqui meu reconhecimento e gratidão pelos momentos familiares de alegria, parceria e amor que me foram proporcionados e ficarão guardados comigo pra sempre.

À família CBI09, à Cia Éxciton, Pedrita, Maricota, Fi e todos os seres especiais que participaram da minha vida Rio clarense e me fazem sentir tamanha gratidão por tantas pessoas iluminadas que passaram no meu caminho. Sem vocês meu percurso não teria sido completo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lara Durães Sette, pela confiança, atenção, paciência e todo o conhecimento transmitido. Grata também pelos momentos de amizade e descontração.

Ao Prof. Dr. Adilson Sartoratto, pela recepção carinhosa, pela oportunidade, paciência e por todo o ensinamento passado.

À Profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira, por ceder gentilmente a amostra de petróleo utilizada no trabalho e pelas válidas sugestões fornecidas.

À todos do LAMAI pela convivência diária no laboratório, conversas jogadas fora, companhia e apoio durante a pesquisa. Sem o coletivo este trabalho não se concretizaria. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Silvio Govone, pela paciência e ajuda com algumas partes estatísticas do trabalho.

À todos do departamento de Bioquímica e Microbiologia do instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, grata pelo suporte e companhia nesses anos de trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP (processo 2014/13205-2) pela concessão das bolsas de estudo.

À todos os meus familiares e amigos que tiveram alguma participação neste meu ciclo de vida, muito obrigada.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A alta atividade industrial e a utilização do petróleo como principal recurso energético atual são alguns dos fatores que colaboram com a frequente liberação dos produtos petroquímicos no ambiente. Ambientes marinhos são suscetíveis à contaminação por petróleo devido à sua estreita relação com as indústrias petrolíferas e micro-organismos derivados desses ambientes possuem potencial para atuar na biorremediação sob estas condições. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a detoxificação e degradação de amostras de petróleo bruto e óleo diesel, a partir da estruturação de dez consórcios microbianos compostos pelos seguintes micro-organismos em combinações variadas: quatro fungos ligninolíticos (basidiomicetos e não basidiomicetos) isolados de invertebrados marinhos, duas bactérias isoladas de reservatório de petróleo (*off-shore*), duas leveduras lipolíticas marinhas da Antártica e um fungo marinho lipolítico da costa brasileira. A avaliação da detoxificação dos compostos estudados foi realizada por meio da análise de toxicidade aguda em Microtox (*Vibrio fischeri*) e com o microcrustáceo *Artemia* sp. O consórcio constituído pelos micro-organismos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus* sp. CBMAI 707 e *Cryptococcus laurentii* CRM 707, se destacou com 46% e 60% de sobreviventes de *Artemia* sp. quando incubado por 21 dias com óleo diesel e petróleo, respectivamente. Estes resultados corroboraram com os dados do microtox, que mostrou uma diminuição da toxicidade quando incubado com diesel, justificando a seleção deste consórcio para prosseguir nas etapas posteriores do trabalho. O planejamento experimental permitiu determinar condições ótimas de temperatura e agitação para o consórcio selecionado, o qual foi posteriormente submetido a dois planejamentos do tipo Plackett–Burman e os melhores ensaios obtidos foram validados experimentalmente. Os ensaios de validação confirmaram o potencial do consórcio na detoxificação dos poluentes estudados e o planejamento experimental possibilitou aumentar a concentração do diesel e utilizar apenas extrato de malte como fonte de carbono adicional, reduzindo o custo do processo. Para o petróleo, houve bons resultados com incubação a 7 dias, mostrando a possibilidade de redução do tempo de ensaio. Não foi detectada atividade de lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase nos ensaios de validação. A atividade de lipase foi maior nos ensaios com petróleo e óleo diesel do que na ausência destes, indicando que houve indução da atividade enzimática pelos poluentes. A análise de CG/EM mostrou mudanças na no perfil cromatográfico do petróleo e do óleo diesel após a incubação com os micro-organismos. Os resultados do presente trabalho destacam a relevância de micro-organismos de ambientes marinhos na detoxificação de poluentes ambientais e estimula novos estudos envolvendo a aplicação de consórcios microbianos marinhos na biorremediação, as enzimas envolvidas no processo e a avaliação da expressão gênica, por meio de estudos de metatranscriptômica.

ABSTRACT

The high industrial activity and the use of petroleum as the current primary energy resource are some of the factors that contribute to the release of petrochemical products in the environment. Marine environments are susceptible to contamination by petroleum due to its close relationship with the oil industry. Micro-organisms derived from these environments have the potential to act in bioremediation under these conditions. Thus, the aim of this study was to analyze the detoxification and degradation of crude oil and diesel samples by ten microbial consortia composed with the following microorganisms in combinations: four ligninolytic fungi (basidiomycetes and not basidiomycetes) isolated from marine invertebrates, two isolated from oil reservoir (off-shore), two marine lipolytic yeast from Antarctic and a marine lypolitic fungus from the Brazilian coast. The evaluation of detoxification was performed by acute toxicity analysis with Microtox (*Vibrio fisheri*) and the microcrustacean *Artemia* sp. The consortium composed by *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus* sp. CBMAI 707 e *Cryptococcus laurentii* CRM 707, showed 46% and 60% of *Artemia* sp. survivors after incubation for 21 days with diesel oil and petroleum, respectively. These results corroborate the microtox data, which showed a decrease in toxicity when incubated with diesel, justifying the selection of this consortium to the next steps of the study. The experimental design allowed us to determine optimal conditions of temperature and agitation to the selected consortium. Two Plackett-Burman experiments were carried out and the best assays were validated experimentally. Validation tests confirmed the potential of the consortium to detoxifify the pollutants. The experimental design enabled the increasing in diesel concentration and the use of only malt extract as additional source, reducing the cost of the process. For petroleum, results after 7 days of incubation showed the possibility of reducing the treatment time. Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase activities were not detected in the validation experiments. The lipase activity was higher in the assays with petroleum and diesel oil in comparison with the assays without the pollutants, indicating that there was an induction on the enzymatic activity by the pollutants. The GC/MS analysis showed changes in the chromatographic profiles of petroleum and diesel oil after incubation with the micro-organisms. Results from the presente work, highlight the relevance of marine-derived micro-organisms in the detoxification of environmental pollutants and stimulate new studies in the field of marine consortium application, the enzymes involved in the process and the evaluation of gene expression by using metatranscriptomic approach.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química de alguns hidrocarbonetos aromáticos do petróleo..... **15**

Figura 2 - Principais derivados de petróleo obtidos após o refino no Brasil (2007)..... **17**

Figura 3 - Custos estimados de técnicas de remediação..... **21**

Figura 4 - Principais vias de degradação de HPAs por bactérias e fungos lignolíticos..... **28**

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 5 - Esquema do teste de antagonismo realizado entre os micro-organismos que constituem os consórcios..... **35**

Figura 6 – Reação de redução do 2,6 Diclorofenol- indofenol..... **37**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 7 – Resultados dos testes de antagonismo realizados com os micro-organismos que constituem os consórcios..... **45**

Figura 8 – Avaliação da biomassa dos micro-organismos sob diferentes temperaturas..... **46**

Figura 9 – Média dos valores de absorbância dos ensaios de DCPIP com os fungos filamentosos após 7 dias de incubação..... **47**

Figura 10 – Réplicas do ensaio controle com *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 demonstrando a adsorção do corante ao micélio..... **48**

Figura 11 – Valores de biomassa obtidos para os dez consórcios microbianos após 14 e 21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm..... **49**

Figura 12 - Atividade da lacase (U/L) dos consórcios 3 e 8 após 14 e 21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm..... **52**

Figura 13 - Biomassa dos ensaios de validação do planejamento PB após 7, 14 e 21 dias de incubação..... **72**

Figura 14 - Atividade da lipase (U/mL) dos ensaios de validação do planejamento PB com óleo diesel após 7, 14 e 21 dias de incubação..... **74**

Figura 15 - Atividade da lipase (U/mL) dos ensaios de validação do planejamento PB com petróleo após 7, 14 e 21 dias de incubação..... **75**

Figura 16 - Perfil cromatográfico do diesel anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 após 7 dias de incubação (b)..... **76**

Figura 17 - Perfil cromatográfico do diesel anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 por 7 dias (b), nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM..... **78**

Figura 18 - Perfil cromatográfico do petróleo anterior ao tratamento (a) e após tratamento **79**

com o consórcio 6 por 7 dias (b).....
Figura 19 - Perfil cromatográfico do petróleo anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 por 7 dias (b), nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM..... **79**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Principais características dos processos de biorremediação utilizados para tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo..... **20**

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2 – Dados referentes aos micro-organismos constituintes dos consórcios..... **34**

Tabela 3 - Micro-organismos constituintes dos consórcios..... **38**

Tabela 4 – Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para o petróleo e óleo diesel..... **43**

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5 – Valores de biomassa média após incubação dos consórcios a 20°C, 25°C e 28°C..... **46**

Tabela 6 – Resultados de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (intervalo de confiança de 95%) em 30 minutos de exposição aos ensaios contendo diesel (21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm)..... **54**

Tabela 7 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios contento diesel e petróleo (média das triplicatas)..... **55**

Tabela 8 – Comparações estatísticas das proporções dos ensaios de toxicidade para os consórcios que apresentaram número de larvas vivas de *Artemia* sp. maiores que 20%..... **57**

Tabela 9 - Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de otimização da temperatura..... **58**

Tabela 10 - Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de otimização da agitação..... **58**

Tabela 11 – Comparações estatísticas das proporções dos testes de toxicidade para os ensaios em diferentes temperaturas..... **61**

Tabela 12 – Comparações estatísticas das proporções dos testes de toxicidade para os ensaios em diferentes valores de agitação..... **61**

Tabela 13 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios do planejamento PB16 contento diesel e petróleo..... **63**

Tabela 14 – Melhores ensaios obtidos para os testes com diesel e petróleo e análise estatística do planejamento de PB sobre o processo de detoxificação dos poluentes..... **63**

Tabela 15 – Valores codificados e reais das variáveis utilizadas para o DCCR nos ensaios com petróleo e óleo diesel..... **65**

Tabela 16 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de DCCR contendo diesel e petróleo..... **65**
Tabela 17 - Coeficientes de regressão do DCCR 2^2 para a detoxificação do óleo diesel pelo consórcio 6..... **66**
Tabela 18 – ANOVA do DCCR 2^2 para a detoxificação do óleo diesel pelo consórcio 6..... **66**
Tabela 19 - Coeficientes de regressão do DCCR 2^2 para a detoxificação do petróleo pelo consórcio 6..... **67**
Tabela 20 – ANOVA do DCCR 2^2 para a detoxificação do petróleo pelo consórcio 6..... **67**
Tabela 21 – Resultados dos ensaios de toxicidade com Microtox e *Artemia* sp. para os ensaios 4 e 13 do PB após 7, 14 e 21 dias de incubação com diesel e petróleo, respectivamente..... **68**
Tabela 22 - Identificação dos metabólitos presentes nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM..... **77**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)
ASW	Água do mar artificial
BH	Meio Bushnell-Hass
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno
CG/EM	Cromatografia gasosa / Espectrômetro de massas
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DCPIP	2,6 diclorofenol- indofenol
DO	Densidade óptica
EM	Extrato de malte
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
LiP	Lignina Peroxidase
MMS	Meio Mineral Suplementado com glicose
MnP	Manganês Peroxidase
PB	Plackett-Burman
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 Petróleo e derivados 15
2.1.1 Óleo diesel 18
2.2 Biorremediação 19
2.3 Fungos de origem marinha 24
2.4 Micro-organismos associados a reservatório de petróleo 25
2.5 Enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos de petróleo 26
2.6 Testes de toxicidade 29
2.7 Planejamento experimental 31
3. OBJETIVO 33
3.1 Objetivos específicos 33
4. MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1 Micro-organismos 34
4.2 Teste de inibição dos micro-organismos 35
4.3 Determinação da temperatura de incubação dos consórcios 35
4.4. Análise da degradação do óleo diesel utilizando DCPIP 36
4.5 Estabelecimento dos consórcios microbianos 37
4.6. Avaliação da capacidade de detoxificação do petróleo e óleo diesel pelos consórcios microbianos 38
4.6.1 Determinação da biomassa dos consórcios após 14 e 21 dias de incubação 39
4.6.2 Análise da atividade enzimática de Lacase e Manganês peroxidase 39
4.6.3 Análise da toxicidade aguda em microtox 40
4.6.4 Análise da toxicidade aguda com *Artemia* sp. 41
4.7 Otimização da detoxificação do petróleo e óleo diesel pelo consórcio microbiano selecionado 42
4.8 Análise dos componentes presentes no petróleo bruto e óleo diesel por GC/MS 44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Teste de inibição dos micro-organismos 45
5.2 Determinação da temperatura de incubação dos consórcios 45
5.3 Análise da degradação do diesel utilizando DCPIP 47

5.4 Avaliação da capacidade de detoxificação do petróleo e óleo diesel pelos consórcios microbianos 48
5.4.1 Determinação da biomassa dos consórcios após 14 e 21 dias de incubação 48
5.4.2 Análise da atividade enzimática de Lacase e Manganês peroxidase 51
5.4.3 Análise da toxicidade aguda em microtox 53
5.4.4 Análise da toxicidade aguda com *Artemia* sp. 54
5.5 Otimização da detoxificação do petróleo e óleo diesel pelo consórcio microbiano selecionado 58
5.5.1 Determinação das condições de temperatura e agitação 58
5.5.2 Planejamento do tipo Plackett–Burman 62
5.5.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 65
5.5.4 Validação experimental 68
5.5.5 Avaliação da atividade enzimática dos ensaios otimizados 72
5.5.5.1 Atividade de lacase, MnP e LiP *72*
5.5.5.2 Atividade de lipase *73*
5.6 Análise dos componentes presentes no petróleo bruto e óleo diesel por CG/EM 75
6. CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS 83
ANEXO A – MATRIZ PLACKETT & BURMAN DE 20 ENSAIOS 93
ANEXO B – MATRIZ PLACKETT & BURMAN DE 16 ENSAIOS 94
ANEXO C - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 95
APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMAS DO DIESEL INCUBADO A 14 E 21 DIAS COM O CONSÓRCIO 6 96

1. INTRODUÇÃO

A alta atividade industrial e a utilização do petróleo como principal recurso energético são alguns dos fatores que colaboram com a frequente liberação dos produtos petroquímicos no ambiente, que pode se dar pela queima de combustíveis fósseis, derramamento acidental de petróleo ou devido ao vazamento dos tanques de armazenamento em postos de combustíveis. Estas substâncias não são facilmente degradadas sob condições naturais e sua ampla distribuição no meio ambiente somada ao potencial de acúmulo e resistência à biodegradação geram grande preocupação com relação ao tema (CERNIGLIA & SUTHERLAND, 2001; HARITASH & KAUSHIK, 2009).

Nesse contexto, a biorremediação vem mostrando ser uma ferramenta promissora na redução dos danos potenciais dessas substâncias, por meio da utilização de micro-organismos com vias metabólicas capazes de degradar poluentes dispersos no ambiente (WATANABE, 2001; HARITASH & KAUSHIK, 2009). Bactérias e fungos são capazes de metabolizar uma ampla variedade de hidrocarbonetos, podendo realizar a mineralização completa dos compostos orgânicos até CO_2 e H_2O ou degradá-los parcialmente até alguns de seus derivados (CERNIGLIA & SUTHERLAND, 2001). Assim, a biorremediação tem ganhado atenção no tratamento de locais contaminados devido ao seu baixo custo e possibilidade de utilização de micro-organismos para degradação do poluente, tornando-os mais solúveis em água, o que possibilita uma posterior degradação por outros micro-organismos (RAHMAN *et. al*, 2002).

Ambientes marinhos são suscetíveis à contaminação por petróleo devido à sua estreita relação com as indústrias petrolíferas (DASTGHEIB *et al*., 2011). Fungos isolados desses ambientes possuem potencial para produção de biomoléculas específicas, devido à sua adaptação às condições de salinidade ali presentes (BUGNI & IRELAND, 2004). Portanto, os micro-organismos isolados de ambientes marinhos podem ser relevantes no processo de biorremediação desses ecossistemas.

A utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia por micro-organismos demanda a existência de enzimas capazes de converter as complexas moléculas presentes no petróleo e seus derivados, em intermediários comuns das suas rotas catabólicas. Apesar de identificadas diversas vias metabólicas de degradação desses compostos em diferentes micro-organismos, as mais bem estudadas são as do metabolismo aeróbio realizado pelas bactérias, pelos fungos ligninolíticos e pelos fungos não-ligninolíticos (JACQUES *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que a biodegradação de hidrocarbonetos complexos, como o petróleo bruto, requer a cooperação de mais de uma espécie microbiana para que seja possível atingir a completa mineralização dos compostos. Micro-organismos isolados são capazes de degradar apenas uma faixa limitada de hidrocarbonetos, enquanto associações microbianas permitem uma capacidade enzimática mais ampla para agir na degradação de compostos complexos (GHAZALI *et. al*, 2004).

O petróleo e seus derivados são a principal fonte de energia atual e o processo de biodegradação desses compostos é complexo e depende da natureza e quantidade de hidrocarbonetos presentes (DAS & CHANDRAN, 2010; RAHMAN *et al.*, 2002). A biorremediação tem como meta principal atingir a mineralização completa do contaminante, ou seja, converte-los em compostos menores de pouca ou nenhuma toxicidade (ANDRADE *et al.*, 2010). No entanto, o conhecimento do sistema em que a biorremediação será aplicada é de fundamental importância, sendo necessário o estudo e determinação dos fatores ambientais envolvidos para que esse processo ocorra (ANDRADE *et al.*, 2010; FUENTES *et al.*, 2014). Dessa forma, deve ser incentivado o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias de baixo custo e alta eficiência, visando minimizar esses problemas e aumentar o conhecimento sobre os processos de degradação e detoxificação.

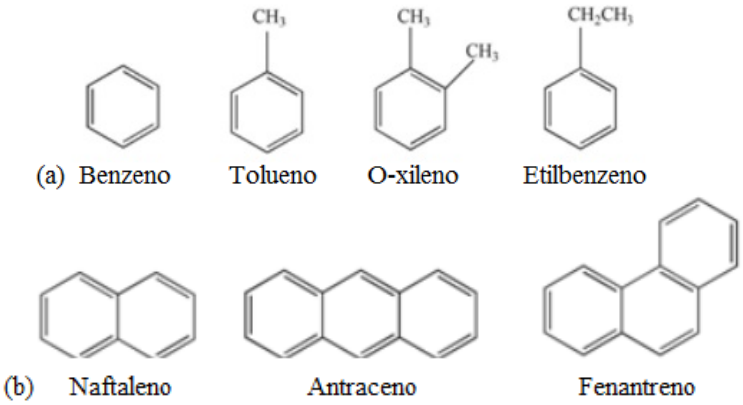
Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a construção de consórcios de micro-organismos de origem marinha para avaliação da capacidade de detoxificação e degradação de amostras de petróleo bruto e óleo diesel, bem como determinar as condições ótimas de detoxificação e análise das atividades enzimáticas possivelmente envolvidas no processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Petróleo e derivados

O petróleo é uma mistura complexa de diversos compostos orgânicos, sendo constituído majoritariamente por hidrocarbonetos (ANDRADE et al., 2010; VASCONCELLOS, 2006). As características físicas e químicas do petróleo variam de acordo com sua origem, mas normalmente é composto principalmente por quatro frações de hidrocarbonetos: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. Os saturados não possuem duplas ligações e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em parafinas, que contém hidrocarbonetos de cadeia alifática, e naftenos, representados por hidrocarbonetos cíclicos compostos por um ou mais anéis saturados (HARAYAMA et al., 1999). Os aromáticos são compostos por hidrocarbonetos contendo pelo menos um anel aromático e, atualmente, alguns dos mais bem estudados incluem os Benzenos, Toluenos, Etilbenzenos e Xilenos (BTEX) (Figura 1a) e os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (Figura 1b). Esses compostos são amplamente estudados e causam grande preocupação quando liberados no ambiente, devido à alta toxicidade e recalcitrância que possuem (FUENTES et al., 2014; ANDRADE et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura química de alguns hidrocarbonetos aromáticos do petróleo.



Fonte: Nyyssönen, M. 2009

(a) BTEX; (b) HPAs.

Ao contrário das frações saturadas e aromáticas, as resinas e os asfaltenos contém compostos polares além do carbono e hidrogênio, apresentando quantidades traço de nitrogênio, enxofre e/ou oxigênio. Os asfaltenos são compostos de alto peso molecular que não são solúveis em solventes como n-heptano, enquanto as resinas são moléculas polares

solúveis nesse solvente e contém compostos heterocíclicos, ácidos e sulfóxidos (HARAYAMA et al., 1999).

A formação inicial de petróleo ocorre através da decomposição dos restos de organismos depositados no fundo dos mares, realizado por bactérias em condições de ausência de oxigênio (anóxia). Além da matéria orgânica, há também deposição de componentes minerais das rochas argilosas, que dão origem à rocha matriz, da qual surgem os produtos que constituem o petróleo (JUCY, 1986). Durante esse processo, o petróleo migra e se acumula em reservatórios, formando os poços petrolíferos (CETESB, 2011).

Os registros mais antigos envolvendo a utilização do petróleo para diversos fins datam da Antiguidade, onde era obtido através de liberações naturais na superfície. No século II d.C., na China, eram utilizados bambus para canalização e transporte de petróleo e gás natural dos poços até o local de uso do produto, onde serviam para iluminação e aquecimento. No entanto, a exploração comercial do petróleo se iniciou em 1859, com a abertura de um poço por Edwin L. Drake na Pensilvânia, Estados Unidos. Drake instalou uma refinaria rudimentar para a extração de querosene e atingiu uma produção de 19 barris/dia (JUCY, 1986; CETESB, 2011).

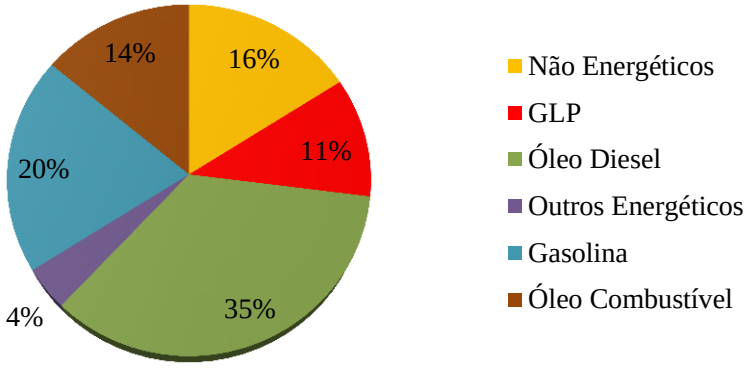
Na segunda metade do século XIX surgiram na Europa e nos Estados Unidos os motores a explosão e a diesel, o que forneceu um forte estímulo às indústrias petrolíferas. No entanto, foi no século XX que a sociedade sofreu uma transformação movida pelos recursos energéticos, ingressando em 1938 na “era do petróleo”, quando 30% da energia utilizada no planeta era proveniente deste recurso. Em 1970, a produção mundial de petróleo atingiu a marca de 50 milhões de barris diários (JUCY, 1986; CETESB, 2011). A demanda por petróleo no mundo permanece crescente até os dias atuais e, segundo a Agência de Energia dos Estados Unidos (EIA), o consumo de petróleo mundial em 2015 foi cerca de 93 milhões de barris diários, enquanto que a perspectiva para 2016 fica na casa de 94,15 milhões de barris por dia (EIA, 2015).

De acordo com os dados do Ministério de Minas e Energia (MME, 2015), em 2014 o petróleo e o gás natural corresponderam a 52,6% da matriz energética mundial, e quando somado ao carvão, essas fontes de combustíveis fósseis representaram 81,6% da matriz de energia do mundo. Essa forte dependência da sociedade em relação à essas fontes energéticas gera grandes impactos ambientais, fazendo com que os governos de diversos países começassem a se preocupar em ponderar as necessidades energéticas da população e buscar fontes de energia alternativas (ANP, 2014).

O petróleo cru não possui aplicação direta, sendo necessário o processo de refino para obtenção de seus derivados. Dessa forma, a produção do petróleo envolve, além da etapa de extração, o transporte do óleo cru (normalmente através de navios ou oleodutos), o refino e a distribuição. Assim, toda a cadeia produtiva fornece riscos de contaminação ambiental por diferentes vias (ANEEL, 2008).

Durante o processo de refino o petróleo é colocado em ebulição, ocorrendo o fracionamento em seus componentes e possibilitando a obtenção dos derivados. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) os principais derivados de petróleo obtidos após o refino, na produção brasileira de 2007, estão representados na Figura 2.

Figura 2 - Principais derivados de petróleo obtidos após o refino no Brasil (2007).



Fonte: ANEEL, 2008

A produção mundial de petróleo atinge bilhões de toneladas por ano e os ecossistemas localizados nas regiões de extração, processamento e rotas de transporte e distribuição estão suscetíveis aos riscos ambientais que estas atividades proporcionam (HARAYAMA et. al, 1999; ARAÚJO et al., 2014). Os maiores campos de extração de petróleo se situam em áreas costeiras, tornando esses locais mais propensos à contaminação, embora outros ecossistemas também sofram influência das atividades petrolíferas (ARAÚJO et al., 2014). A Companhia Ambiental do estado de São Paulo (CETESB, 2011) lista 21 principais acidentes registrados de 1967 até 2010 envolvendo derramamentos de petróleo nos oceanos do mundo, relatando milhares de m^3 de óleo vazado em todas as ocorrências. O recente e severo caso da explosão

da plataforma *Deepwater Horizon* em 2010, no Golfo do México, a 80 km do estado de Louisiana (EUA), despejou 779 mil toneladas de óleo no mar, atingindo tanto o alto mar como a zona costeira e causou graves prejuízos à vida marinha local, atividade pesqueira, turismo, além de outros danos ecológicos e sociais envolvidos (CETESB, 2016).

Dessa forma, devido aos diversos riscos e impactos ambientais decorrentes do transporte, produção e comercialização do petróleo e seus derivados, o desenvolvimento de pesquisas e novas tecnologias de baixo custo e alta eficiência devem ser incentivadas para melhorar a prevenção e resolução desses problemas.

2.1.1 Óleo diesel

O diesel é um combustível derivado do petróleo, obtido a partir do processo de refino, com temperatura de destilação na faixa de 130 a 370°C. O óleo diesel é constituído principalmente por hidrocarbonetos alifáticos contendo de 8 a 28 átomos de carbono na cadeia e, em menor escala, possui também substâncias que contém átomos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais, dentre outros (MENEZES et al., 2006; SOUZA, 2008). No entanto, comercialmente a constituição do diesel é bastante variável, uma vez que provém de petróleo de diferentes origens e pode ser submetido a diferentes processos de refino (BRAUN et al., 2003).

O diesel possui alto teor de enxofre e esta característica é considerada para sua classificação de acordo com a ANP. Segundo a Resolução ANP n° 50/2013 (BRASIL, 2013) os óleos diesel de uso rodoviário se classificam em:

1) Óleo diesel A: combustível produzido por processos de refino do petróleo, centrais de matérias-primas petroquímicas ou autorizadas, sem a adição de biodiesel;

2) Óleo diesel B: óleo diesel A com adição de biodiesel na concentração estabelecida pela legislação.

Os tipos de diesel descritos acima são divididos de acordo com o nível máximo de enxofre que possuem, conforme nomenclatura estabelecida no Artigo 3° da Resolução ANP n° 65/2011 (BRASIL, 2011):

1) Óleo diesel A S10 e B S10: teor máximo de enxofre de 10 mg/kg;

2) Óleo diesel A S50 e B S50: teor máximo de enxofre de 50 mg/kg;

3) Óleo diesel A S500 e B S500: teor máximo de enxofre de 500 mg/kg;

4) Óleo diesel A S1800 e B S1800: teor máximo de enxofre de 1800 mg/kg.

Seguindo as normas da Resolução ANP n° 46/2012, a substituição do óleo diesel S1800 pelo S500 no mercado foi iniciada em 2012, sendo vetada completamente sua comercialização em 2014, enquanto o diesel S50 deixou de ser comercializado em 2013 e foi integralmente substituído pelo S10. Esta alteração no teor de enxofre dos combustíveis teve como objetivo diminuir a emissão de material particulado e, consequentemente, reduzir a poluição do ar principalmente nos centros urbanos. Essa medida foi realizada devido à exigências da nova fase L6 do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE), descrita na Resolução n° 415/2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

Além da poluição envolvendo a queima do diesel através dos motores veiculares, os vazamentos dos tanques de armazenamento em postos de combustíveis é outro problema ambiental frequente. Nestes casos o impacto ambiental pode ser grave devido à contaminações das águas subterrâneas e do solo, afetando a qualidade dos recursos hídricos (CETESB). Além disso, pode ocorrer a liberação deste combustível no ambiente devido a acidentes por rompimento de oleodutos, como ocorrido em 2001 no Córrego Caninana, com despejo de 4.000 litros de óleo diesel, ocasionando severos danos a todo o ecossistema da região (GOMES, 2007).

2.2 Biorremediação

A biorremediação é uma técnica que utiliza o potencial metabólico de micro-organismos para degradar poluentes dispersos no ambiente (WATANABE, 2001). Este processo geralmente é realizado em ambientes abertos não estéreis que contêm uma comunidade microbiana ativa. Entretanto, para obtenção de sucesso é necessário que os micro-organismos corretos estejam no local adequado e com fatores ambientais que permitam que a degradação ocorra (WATANABE, 2001; BOOPATHY, 2000).

As técnicas de biorremediação podem ser empregadas *in situ*, ou seja, no local da contaminação, ou *ex situ*, quando há remoção física do material contaminado para tratamento. No primeiro caso, normalmente o custo de aplicação das técnicas são mais baixos e os impactos ambientais envolvidos são menores, pois não há remoção de parte da área contaminada. No entanto, apesar do processo de escavação e remoção do material contaminado causar maior impacto ambiental e resultar em um aumento do custo no

tratamento *ex-situ*, é vantajosa a possibilidade de controle dos fatores ambientais que estimulam a biodegradação (ANDRADE et al., 2010; BOOPATHY,2000).

Duas principais técnicas de biorremediação *in situ* são a bioestimulação e a bioaumentação. A bioestimulação tem como objetivo induzir o desenvolvimento da microbiota autóctone da região de modo a acelerar o processo de degradação do contaminante, fornecendo nutrientes ou oxigênio à estes micro-organismos indígenos. Já na bioaumentação há introdução de micro-organismos exógenos no local contaminado, devido ao conhecido potencial degradador dos organismos a serem inoculados. As tecnologias mais comuns de biorremediação *ex situ* são as biopilhas, compostagem e *landfarming*, as quais tem como objetivo principal acelerar a degradação de hidrocarbonetos adicionando nutrientes e oxigênio a baixo custo (ANDRADE et al., 2010; BOOPATHY, 2000; FUENTES et al., 2014). As principais características dos processos de biorremediação citados acima estão descritos na Tabela 1.

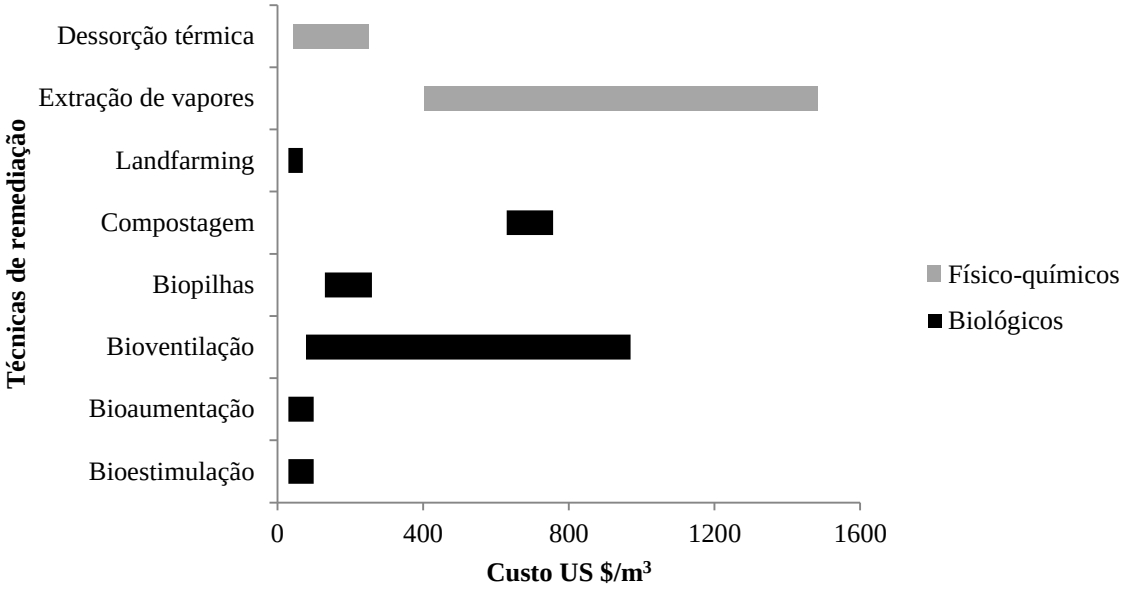
Tabela 1 - Principais características dos processos de biorremediação utilizados para tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

Técnicas	Principais características	Observações
Bioaumentação Organismo isolado Consórcio microbiano	Adição de micro-organismos degradadores Degradação de moléculas individuais ou misturas simples Degradação de misturas de poluentes complexos	Organismos introduzidos podem ser inibidos por outros poluentes ou micro-organismos nativos
Bioestimulação Fertilizantes (Bio)surfactantes	Gerenciamento dos fatores ambientais Restauração do equilíbrio de nutrientes, otimização da razão C/N/P Elevação da disponibilidade do poluente	A razão ótima de C/N/P e a disponibilidade do poluente tem que ser determinados
Bioventilação	Aumento da disponibilidade de oxigênio	Necessário uma adequada rede de tubulação
Biopilhas/ compostagem	Ativação da atividade microbiana pela mistura com solo/matéria orgânica	Necessário um regime de aeração
Landfarming	Revestimento de solo. Pode ser combinado com melhoramentos de nutrientes	Necessário uma grande superfície de solo

Fonte: Adaptado de FUENTES *et al*., 2014

A escolha de uma estratégia de remediação apropriada depende das propriedades físico-químicas do local contaminado e do nível e tempo de contaminação. Além disso, combinações de técnicas *in situ* e *ex situ* podem ser realizadas (FUENTES et al., 2014). Outro fator importante a ser considerado na seleção do tratamento é a relação custo-benefício e, normalmente, a biorremediação possui custos reduzidos em relação às outras tecnologias de remediação, conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3 - Custos estimados de técnicas de remediação.



Fonte: FUENTES et al., 2014.

Além da biorremedição ser uma técnica economicamente viável, outra importante vantagem é a capacidade de eliminação permanente do contaminante através da mineralização dos compostos, enquanto outros métodos transferem o material contaminado de um local para outro (BOOPATHY, 2000). Adicionalmente, a possibilidade do tratamento *in situ* reduz consideravelmente o impacto ambiental na área tratada em relação a outras técnicas de remediação.

Os micro-organismos comumente utilizados em técnicas de biorremediação são as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras, devido à capacidade que possuem de metabolizar uma ampla variedade de hidrocarbonetos, podendo realizar a mineralização completa dos compostos orgânicos ou degradá-los parcialmente até alguns de seus derivados (CERNIGLIA & SUTHERLAND, 2001). Do ponto de vista metabólico, a biorremediação pode ocorrer, principalmente, por via aeróbia ou anaeróbia. O processo aeróbio utiliza o oxigênio como receptor de elétrons e o hidrocarboneto é oxidado, normalmente com atuação das enzimas oxigenases. Já a via anaeróbia envolve outros compostos como aceptores de elétrons, como o nitrato, sulfato, ferro, dióxido de carbono e manganês (BOOPATHY, 2000).

No entanto, estudos têm demonstrado que a biodegradação de hidrocarbonetos complexos, como o petróleo bruto, requer a cooperação de mais de uma espécie microbiana para que seja possível atingir a completa mineralização dos compostos. Micro-organismos

isolados são capazes de degradar apenas uma faixa limitada de hidrocarbonetos, enquanto associações microbianas permitem uma capacidade enzimática mais ampla para agir na degradação de compostos mais complexos (GHAZALI et. al, 2004). Ameen et al. (2015) utilizaram cinco fungos isolados de sedimentos de mangue em testes com óleo diesel como única fonte de carbono e, quando avaliados de forma isolada e em consórcio, verificou-se que a taxa de degradação aumentou quando os micro-organismos agiram em conjunto, demonstrando o sinergismo existente entre as espécies para que sejam capazes de sobreviver quando a fonte de energia é limitada e confinada a fontes de carbonos complexos. De forma semelhante, Rahman e colaboradores (2002) demonstraram que um consórcio bacteriano foi mais eficiente na degradação de petróleo bruto do que as espécies isoladas, atingindo 78% de degradação após vinte dias a 30 ^{o}C e pH 7,5.

Além do grande número de estudos envolvendo a remediação biológica de áreas contaminadas, a aplicação das técnicas *in situ* de biorremediação já foram realizadas em casos de derramamentos de petróleo. O primeiro caso que envolveu uma tentativa de limpeza expressiva de derramamento de petróleo utilizando a biorremediação como ferramenta foi em 1989, com o acidente do navio petroleiro Exxon Valdez. Este derramamento foi responsável pelo despejo de 37 mil toneladas de petróleo em Prince William Sound, no Alaska, levando à mortalidade de milhares de mamíferos e aves marinhas, redução da população de organismos das regiões intertidal e subtidal e diversos outros impactos ambientais de longo prazo (ZHU et al., 2004). Foram obtidos resultados positivos com a bioestimulação, através da aplicação de fertilizantes na região afetada, acelerando o desenvolvimento e atividade da microbiota local e atingindo taxas de degradação de hidrocarbonetos de 1,2% ao dia. Análises de sedimento mostraram que 25 a 30% dos hidrocarbonetos retidos na costa litorânea foram removidos nas primeiras semanas após a aplicação dos fertilizantes (ATLAS, 1995; FUENTES et al., 2014).

Estudos tem demonstrado que a técnica de bioaumentação é mais adequada para aplicação em locais onde não há micro-organismos autóctones suficientes ou se esta população microbiana nativa não possui a maquinaria metabólica necessária para atuar na degradação do poluente, já que a competição entre os micro-organismos inoculados e os indígenos pode ser um fator prejudicial ao sucesso desta técnica. Além disso, fatores ambientais como flutuações extremas de temperatura, pH, depleção de nutrientes, oxigênio e altas concentrações de componentes tóxicos podem acarretar no fracasso desta técnica em campo (TYAGI et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011; ZHU et al., 2004). Desta forma, a bioaumentação é uma ferramenta potencial para tratamentos de componentes específicos do

petróleo, em derramamentos isolados de áreas confinadas ou em ambientes onde a microbiota nativa é deficiente (ZHU et al., 2004). No entanto, diferentes abordagens estão sendo desenvolvidas com objetivo de aumentar a persistência e atividade de micro-organismos exógenos no ambiente a ser tratado, através de técnicas como a encapsulação da célula em um suporte como o alginato, ou ainda a utilização da transferência horizontal de genes a partir de micro-organismos capazes de atuar na remediação dos contaminantes para micro-organismos autóctones da área (GENTRY et al., 2004).

A utilização de reatores biológicos para a realização da biodegradação por micro-organismos é uma técnica empregada no tratamento de resíduos de petróleo e é vantajosa em relação à necessidade de manutenção de condições ótimas para a degradação de resíduos complexos. Esta é uma tecnologia viável, que pode ser adaptada para tratamento de solo ou água com níveis altos de contaminantes, podendo ser operados em série sob condições aeróbias ou anaeróbias (FRANCISCO & FRANÇA, 2007; OLIVEIRA, 2003). Os reatores biológicos são utilizados para tratar resíduos de refinarias de petróleo, indústrias de celulose, têxtil, farmacêutica, dentre outras e como a presença de micro-organismos autóctones capazes de degradar os poluentes não é garantida, é comum a necessidade de inserção nesses biorreatores de micro-organismos exógenos com potencial para degradação (PEREIRA & FREITAS, 2012).

Ururahy et al. (1998), tratou a borra oleosa proveniente do tanque de estocagem de resíduos da Refinaria Duque de Caxias (REDUC) em um biorreator do tipo CSTR (*Continuous Flow Stirred Tank Reactor*) com capacidade para 9 litros, utilizando um consórcio de micro-organismo previamente adaptado e submetido a uma concentração de 5% (v/v) do contaminante. Os compostos parafínicos foram degradados preferencialmente em relação ao HPAs, mas os autores tiveram valores elevados de consumo da borra de petróleo pelos micro-organismos e concluíram que o processo de biodegradação conduzido em biorreator é viável para tratamento desse resíduo. Além disso, Zhao e colaboradores (2006) investigaram o uso de dois grupos de micro-organismos imobilizados no pré-tratamento de águas residuais do campo de petróleo, utilizando um par de reatores do tipo BAF (*Biological Aerated Filter*) durante 142 dias, atingindo níveis de degradação de 78% do carbono orgânico total e de 94% para o óleo.

A biorremediação se mostra como uma ferramenta de menor impacto ambiental, maior custo-benefício e tecnicamente eficiente quando comparada a outros tratamentos físicos ou

químicos de descontaminação de ambientes com hidrocarbonetos de petróleo. A existência de micro-organismos competentes para atuar na biorremediação, suas necessidades nutricionais e condições adequadas de crescimento devem ser primeiramente determinadas em escala laboratorial, permitindo a construção de um conhecimento mais aprofundado dos fatores ambientais que podem limitar ou impedir a biodegradação do petróleo em aplicações *in situ* (TYAGI et al., 2011).

2.3 Fungos de origem marinha

Os campos petrolíferos não são distribuídos uniformemente ao redor do mundo, tornando necessário o transporte marítimo internacional de cerca da metade da produção mundial de petróleo (HARAYAMA et al., 1999). Assim, ambientes marinhos se tornam suscetíveis à contaminação por petróleo devido à esta estreita relação com as indústrias petrolíferas (DASTGHEIB et al., 2011). Os fungos isolados desses ambientes possuem um grande potencial para produção de biomoléculas específicas e podem ter grande importância no processo de biorremediação desses ecossistemas (BUGNI & IRELAND, 2004).

Os fungos marinhos são classificados em obrigatórios, os quais são capazes de crescer e esporular exclusivamente em ambientes marinhos ou estuarinos, e facultativos, que são provenientes de ambientes de água doce ou terrestres, mas são capazes de crescer e reproduzir em ambiente marinho. Neste ambiente, estes organismos possuem papel fundamental na decomposição do tecido vegetal e animal (lignina, queratina, celulose, dentre outros) e na reciclagem de nutrientes (BUGNI & IRELAND 2004). Apesar dos fungos marinhos comumente apresentarem características morfológicas semelhantes aos terrestres, as condições ambientais a que estão submetidos como salinidade, baixas temperaturas, pH extremos e a grande variedade de minerais presentes na água do mar contribuem para as diferenças entre as enzimas produzidas por esses micro-organismos em comparação com as enzimas produzidas por seus homólogos terrestres (JONES, 2000; PANG et al., 2011)

Os fungos marinhos são bem conhecidos por produzir uma ampla diversidade de enzimas biologicamente importantes. Velmurugan & Lee (2012) reportam várias pesquisas que mostram fungos isolados de ambientes marinhos capazes de produzir diferentes compostos bioativos e enzimas industrialmente significantes, como celulases, xilanases, compostos antibacterianos, anticâncer e enzimas ligninolíticas. Raghukumar et al. (2004) demonstraram a capacidade do fungo marinho basidiomiceto *Flavodon flavus* em descolorir águas residuais de destilaria de cana-de-açúcar e, simultaneamente, reduzir a toxicidade do

benzo[a]pireno presente na amostra, atingindo uma queda de 68% deste HPA em 5 dias de tratamento da amostra com o fungo.

Além disso, estudos anteriores do grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dra. Lara Durães Sette mostraram a capacidade de fungos isolados de ambiente marinho na degradação de corantes têxteis e HPAs. Passarini et al. (2011) avaliou a capacidade de degradação de pireno e benzo[a]pireno por oito fungos derivados de ambiente marinho e três espécies foram capazes de degradar mais de 30% desses HPAs. O fungo *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 degradou 99,7% de pireno e 76,6% de benzo[a]pireno após 8 e 16 dias, respectivamente, enquanto *Mucor racemosus* CBMAI 847 mostrou uma degradação de mais 50% do benzo[a]pireno após 16 dias de incubação e o fungo *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 apresentou degradação de mais de 30% para ambos os HPAs estudados após 8 dias de incubação. Magrini (2012) avaliou a degradação dos HPAs pireno e benzo[a]pireno por três basidiomicetos derivados de ambiente marinho e selecionou o fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 como o mais eficiente, pois atingiu mais de 90% de degradação da quantidade inicial de ambos os HPAs após 7 dias de incubação.

Segundo Leahy & Colwell (1990), bactérias e fungos atuam primariamente na biodegradação de hidrocarbonetos despejados no ambiente e uma ampla variedade de gêneros desses micro-organismos possuem habilidade de degradar ou utilizar esses compostos como substrato. Em ambiente marinho as bactérias são geralmente consideradas os principais representantes da comunidade microbiana capazes de degradar hidrocarbonetos, porém os fungos também são reportados como importantes habitantes desse nicho com capacidade de degradação de xenobióticos (LEAHY & COLWELL, 1990). Portanto, consórcios envolvendo uma mistura desses micro-organismos podem atuar de forma mais ampla na degradação de misturas mais complexas como o petróleo.

2.4 Micro-organismos associados a reservatório de petróleo

A possibilidade de organismos sobreviverem e se desenvolverem em reservatórios de petróleo depende das características físicas e composição química desses ambientes. A temperatura é o principal fator limitante para o crescimento microbiano nesses locais, já que se eleva com o aumento da profundidade em uma taxa média de 3°C a cada 100 m. Estudos sugerem que a presença de bactérias autóctones nos reservatórios de petróleo suportam um limite de temperatura entre 80°C e 90°C (MAGOT et al., 2000). Os micro-organismos presentes nestes locais podem atuar na biodegradação do petróleo, tornando interessante o estudo desta microbiota para aplicação na biorremediação.

A água de formação é produzida juntamente com o petróleo e ocorre de forma natural nos poros de uma rocha, sendo separada do petróleo após sua extração. Geralmente esta água é hipersalina, podendo alcançar concentrações de até 250 g/L de sólidos dissolvidos. (TELES *et al.*, 2010). Dessa forma, a salinidade e o pH da água de formação também podem limitar a atividade bacteriana, sendo que o pH geralmente varia de 5 a 8 (MAGOT et al., 2000).

Vasconcellos (2006) coletou amostras de água de formação de petróleo e óleo na Formação Pampo, Brasil, e recuperou 92 linhagens de bactérias aeróbias desses ambientes. Quando analisada a biodegradação de compostos presentes no petróleo pelas espécies bacterianas aeróbias isoladas, foram obtidos bons resultados com três espécies do gênero *Bacillus*, chegando a 100% de degradação do ácido nonadecanóico. *Bacillus subtillis* apresentou 92% de degradação dos hidrocarbonetos diidrofenantreno e fitano. Além disso, quatro estirpes bacterianas foram testadas em relação à produção de EPS (*Extracellular polymeric substances*), capacidade de emulsificação e atividade biodegradora de hidrocarbonetos, sendo duas espécies do gênero *Bacillus* (CBMAI 707 e CBMAI 751), *Dietzia* sp. CBMAI 705 e *Pseudomonas* sp. CBMAI 754. O estudo verificou que as duas estirpes de *Bacillus* apresentaram a maior produção de EPS quando fenantreno e n-octadecano estavam disponíveis como única fonte de carbono, enquanto *Dietzia* sp. e *Pseudomonas* sp. tiveram altos índices de biodegradação desses hidrocarbonetos, apesar de não ter sido detectada produção de EPS por essas bactérias (VASCONCELLOS et al., 2011).

2.5 Enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos de petróleo

A utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia por micro-organismos demanda a existência de enzimas capazes de converter as complexas moléculas presentes no petróleo e seus derivados, em intermediários comuns das suas rotas catabólicas. Apesar de identificadas diversas vias metabólicas de degradação desses compostos em diferentes micro-organismos, as mais bem estudadas são as do metabolismo aeróbio realizado pelas bactérias, pelos fungos ligninolíticos e pelos fungos não-ligninolíticos (JACQUES et al., 2007).

Os fungos ligninolíticos são capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, como os HPAs, através da produção de enzimas de ação extracelular comumente utilizadas na despolimerização da lignina, presente na madeira e outros tipos de matéria orgânica. As principais enzimas envolvidas nesse processo são a Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e lacase. A baixa especificidade de substratos dessas enzimas e a capacidade de se difundir na matriz do solo contaminado, tem atraído atenção no uso desses

fungos para degradar HPAs recalcitrantes (BAMFORTH & SINGLETON, 2005; NILADEVI, 2009).

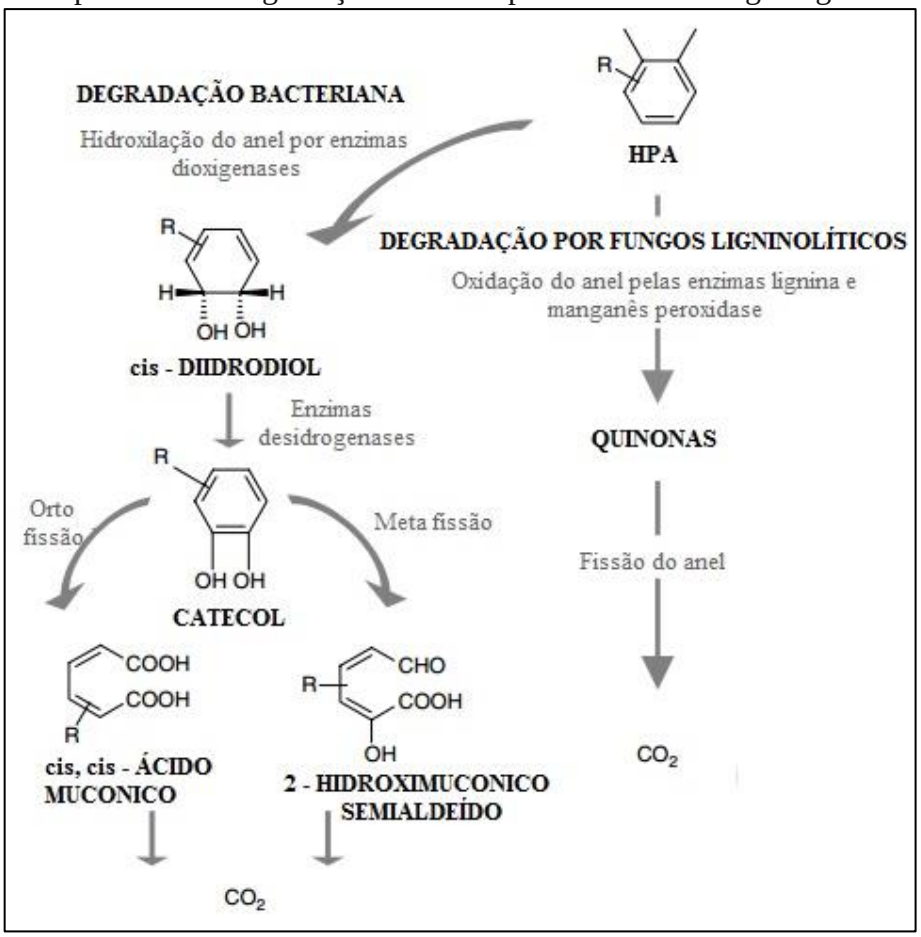
A LiP é uma das enzimas mais importantes envolvidas na degradação da lignina e possui um alto potencial redox. Esta enzima é uma heme peroxidase que possui um mecanismo catalítico clássico de peroxidase, onde H_2O_2 é requerido no processo. A MnP é outra importante enzima produzida por degradadores de lignina e também se caracteriza como uma heme peroxidase dependente de H_2O_2 para sua atividade. Entretanto, o potencial redox desta enzima é menor que o da LiP. O princípio de ação da MnP se baseia na oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} utilizando H_2O_2 como oxidante. Além disso, ácidos orgânicos podem facilitar a liberação do Mn^{3+} do sítio ativo da enzima (NILADEVI, 2009). As lacases são polifenol oxidases, que pertencem a família das multicobre oxidase azuis. Polifenol oxidases possuem como característica comum a capacidade de oxidar compostos aromáticos com oxigênio molecular como aceptor final de elétrons. Dessa forma, as lacases não necessitam de H_2O_2 para oxidar seus substratos como a LiP e MnP, porém requerem uma molécula de oxigênio como co-substrato. A atividade desta enzima é largamente distribuída entre diferentes grupos de fungos e bactérias, além de algumas plantas e insetos. Sua capacidade de oxidar uma grande variedade de substratos permite sua ampla exploração em aplicações industriais e na biorremediação, incluindo degradação de HPAs (MADHAVI & LELE, 2009; NILADEVI, 2009).

Estudos já reportaram a produção de enzimas ligninolíticas por fungos derivados de ambiente marinho. Raghukumar (2000) utilizou fungos de origem marinha em testes de descoloração de corantes sintéticos e constatou a produção de lacase e MnP por três fungos e adicionalmente a produção de LiP pelo fungo *Flavodon flavus*, tendo obtido cerca de 60 a 90% de descoloração entre 3 e 10 dias. Além disso, em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette foram obtidas produções de lacase, LiP e MnP pelos fungos isolados de cnidários marinhos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847, na presença de salinidade (BONUGLI-SANTOS et al. 2010a).

A via metabólica utilizada pelos fungos não-ligninolíticos envolve a oxidação do anel aromático através da enzima P_{450} monoxigenase, produzindo o óxido areno. O óxido areno é transformado em trans-diidrodiol pela ação de epóxido hidrolases, o qual é convertido em fenantrol por desidratação e posteriormente transformado nos produtos finais da via de degradação desses fungos (JACQUES et al., 2007).

No metabolismo aeróbio bacteriano, as principais enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos são as oxigenases, as quais catalisam a adição de oxigênio molecular ao substrato. As dioxigenases catalisam a adição de dois grupos hidroxil, enquanto as monoxigenases catalisam a introdução de um átomo de oxigênio na molécula do hidrocarboneto (FUENTES et al., 2014). O principal mecanismo das bactérias aeróbias para degradação dos HPAs é a oxidação inicial do anel benzênico por ação da enzima dioxigenase, a qual formará o cis-diidrodiol. O diidrodiol será desidrogenado, formando outros compostos intermediários que poderão ser metabolizados até CO_2 e H_2O (BAMFORTH & SINGLETON, 2005). A Figura 4 ilustra as principais vias de degradação de HPAs por fungos e bactérias.

Figura 4 - Principais vias de degradação de HPAs por bactérias e fungos ligninolíticos.



Fonte: Adaptado de Bamforth & Singleton (2005).

As lipases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, formando ácidos graxos e glicerol (GUPTA et al., 2003). Dentro de suas diversas aplicações biotecnológicas, a utilização de micro-organismos lipolíticos para degradação do petróleo e seus derivados já foi descrita (HASAN et al., 2006; JOSEPH et al., 2007). Segundo Joseph et

al. (2007), lipases ativas em baixas temperaturas apresentam novas oportunidades de exploração biotecnológica devido à sua alta flexibilidade e atividade catalítica em temperaturas baixas e médias. Margesin et al.(2007) avaliaram a biodegradação em solos contaminados com óleo diesel na ausência e presença de diferentes tratamentos com fertilizantes e monitorou a taxa de biodegradação através da atividade da lipase, pois os produtos liberados na quebra de hidrocarbonetos induzem a atividade enzimática e podem servir de substrato para hidrolases. Foi verificado um aumento da taxa desta enzima quando os níveis de óleo diesel estavam altos, demonstrando a indução da atividade enzimática pela contaminação (MARGESIN et al., 2007), relação que também já foi descrita por Kato et al. (2001). Além disso, Adekunkle & Adebambo (2007) demonstraram que fungos responsáveis pela degradação de óleos de sementes tiveram resultados promissores quando testados na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Bamforth & Singleton (2005) reportam estudos de degradação de HPAs que demonstram que a combinação de enzimas ligninolíticas, citocromo P_{450} monoxigenase e epóxido hidrolases tem maiores chances de atingir a mineralização completa de hidrocarbonetos de petróleo, reiterando a importância da atuação conjunta e sinérgica dos micro-organismos para a degradação de compostos complexos.

2.6 Testes de toxicidade

A toxicologia estuda os efeitos nocivos de substâncias químicas sobre organismos vivos. Os testes de toxicidade são ensaios realizados em laboratório sob condições específicas e controladas com objetivo de estimar a toxicidade dessas substâncias (COSTA et al., 2008). A biorremediação tem como meta principal atingir a mineralização completa do contaminante, ou seja, converte-los em compostos menores de pouca ou nenhuma toxicidade (ANDRADE et al., 2010). Diversas pesquisas com biorremediação monitoram o sucesso do tratamento pelo grau de remoção do contaminante original, não considerando a possibilidade de produção biológica de metabólitos mais tóxicos após a quebra. Dessa forma, é fundamental garantir que o material contaminado esteja adequadamente detoxificado após o final do tratamento, tornando extremamente importante o estabelecimento de uma integração entre a toxicologia e a biorremediação (BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

No caso de contaminação do mar por petróleo ou derivados, há duas principais causas de impactos nos organismos marinhos, que são o efeito físico acarretado pelo recobrimento do óleo e o efeito químico relacionado à toxicidade do poluente. O contato dos organismos marinhos com a parcela tóxica do óleo, principalmente os compostos aromáticos, pode levar à

morte por intoxicação. O benzeno, tolueno e xileno são compostos especialmente prejudiciais, pois são relativamente solúveis em água, tornando os organismos marinhos mais vulneráveis através da absorção desses contaminantes por tecidos ou ingestão direta de alimentos e água contaminada. Os HPAs são outro grupo de compostos aromáticos persistentes no ambiente e altamente tóxicos e carcinogênicos ao homem e aos organismos marinhos (CETESB, 2015).

A CETESB lista alguns dos graves efeitos causados pela interação do óleo com organismos, sendo eles: morte direta por recobrimento e asfixia, morte direta por intoxicação, morte de larvas e recrutas, redução na taxa de fertilização, distúrbio dos recursos alimentares nos níveis tróficos superiores, bioacumulação, efeitos indiretos subletais e incorporação de substâncias carcinogênicas. Assim, diversos testes toxicológicos se baseiam nesses efeitos para mensurar o grau de toxicidade de uma amostra.

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos ou crônicos, de acordo com a duração e as respostas obtidas. Os testes de toxicidade aguda se caracterizam pela exposição do organismo à amostra em curto período de tempo, com o intuito de medir a resposta do organismo-teste em relação à concentração do agente tóxico. Já os testes de toxicidade crônica são realizados para determinar o efeito de contaminantes nos organismos após um longo período de exposição à amostra (COSTA et al., 2008; CETESB, 2015).

Crustáceos são comumente utilizados em testes de toxicidade, pois possuem um papel fundamental na cadeia alimentar de ambientes aquáticos, são sensíveis aos contaminantes ambientais, possuem um ciclo de vida curto e podem ser facilmente cultivados em laboratório (COSTA et al., 2008). O microcrustáceo do gênero *Artemia* é proveniente de ambiente de água salgada e é frequentemente utilizado em testes de toxicidade (COSTA et al., 2008; KRISHNARAJU et al., 2005; LOPES et al., 2010; LHULLIER et al., 2006). As espécies desse gênero possuem uma capacidade notável de adaptação a condições extremas, principalmente a ambientes hipersalinos (NUNES et al., 2006), fazendo com que seu uso em testes toxicológicos seja interessante quando se pretende avaliar amostras de ambientes com alta salinidade. Outro aspecto que torna vantajoso o uso desse crustáceo é o fato de que seus ovos são resistentes a longos períodos de secagem e estocagem, facilitando sua manutenção em laboratório.

Conforme reportado por Nunes et al. (2006), diversos estudos de toxicologia utilizando espécies de *Artemia* tem sido realizados envolvendo diferentes tipos de compostos, como metais pesados, herbicidas, fármacos, solventes orgânicos, dentre outros. Além disso, Nastro et al. (2014) utilizaram testes com *Artemia salina* como um tipo de abordagem ecotoxicológica para avaliar o processo de biorremediação de solo contaminado com HPAs e

observaram uma redução na toxicidade desses compostos, tendo obtido uma correlação positiva entre os testes com *Artemia salina*, testes de fitotoxicidade e outros testes de toxicidade aguda.

Apesar dos testes de toxicidade de ambientes aquáticos mais tradicionais envolverem algas, crustáceos e peixes, ensaios com bactérias também são realizados e demandam um volume menor de amostra e um tempo de exposição reduzido frente aos outros testes. O teste com microtox utiliza a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* e é comumente utilizado no controle da poluição de águas e efluentes industriais, sendo portanto, uma metodologia adequada para análises com micro-organismos de origem marinha (COSTA et al., 2008). Lau e colaboradores (2003) utilizaram o composto residual da indústria de cogumelos, que contém nutrientes e enzimas remanescentes, para tratar amostras de solos contaminados com HPAs e utilizou o Microtox para avaliação da toxicidade após o tratamento, obtendo uma redução significativa da toxicidade do HPA no período de dois dias.

2.7 Planejamento experimental

Diversos fatores ambientais podem influenciar o crescimento dos micro-organismos e sua eficiência em degradar poluentes, como o pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura e disponibilidade dos contaminantes (BAMFORTH & SINGLETON, 2005). Considerando que estas condições são bastante variáveis em relação aos locais onde processos de biorremediação possam ser aplicados, torna-se importante que se conheça as condições ótimas em que os micro-organismos estudados sejam capazes de degradar e detoxificar os poluentes.

O planejamento experimental é uma ferramenta que permite a determinação de condições otimizadas do processo estudado, baseado em princípios estatísticos. A triagem e a análise dos fatores interferentes em um processo podem ser realizadas variando-se um fator por vez ou através de delineamentos fatoriais. No entanto, em estudos onde há muitas variáveis envolvidas é necessário minimizar o tempo e os custos, tornando o planejamento experimental uma escolha bastante viável para alcançar a maximização do rendimento do processo (RODRIGUES & IEMMA 2009).

Para alcançar as condições ótimas de um processo diversas estratégias podem ser traçadas, sendo que os delineamentos fatoriais fracionados ou os de Plackett & Burman são comumente utilizados para seleção prévia das variáveis que devem ser consideradas até posteriormente chegar ao planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR), possibilitando a avaliação dos efeitos individuais de cada variável e suas interações sobre uma determinada resposta. Além disso, é importante avaliar a

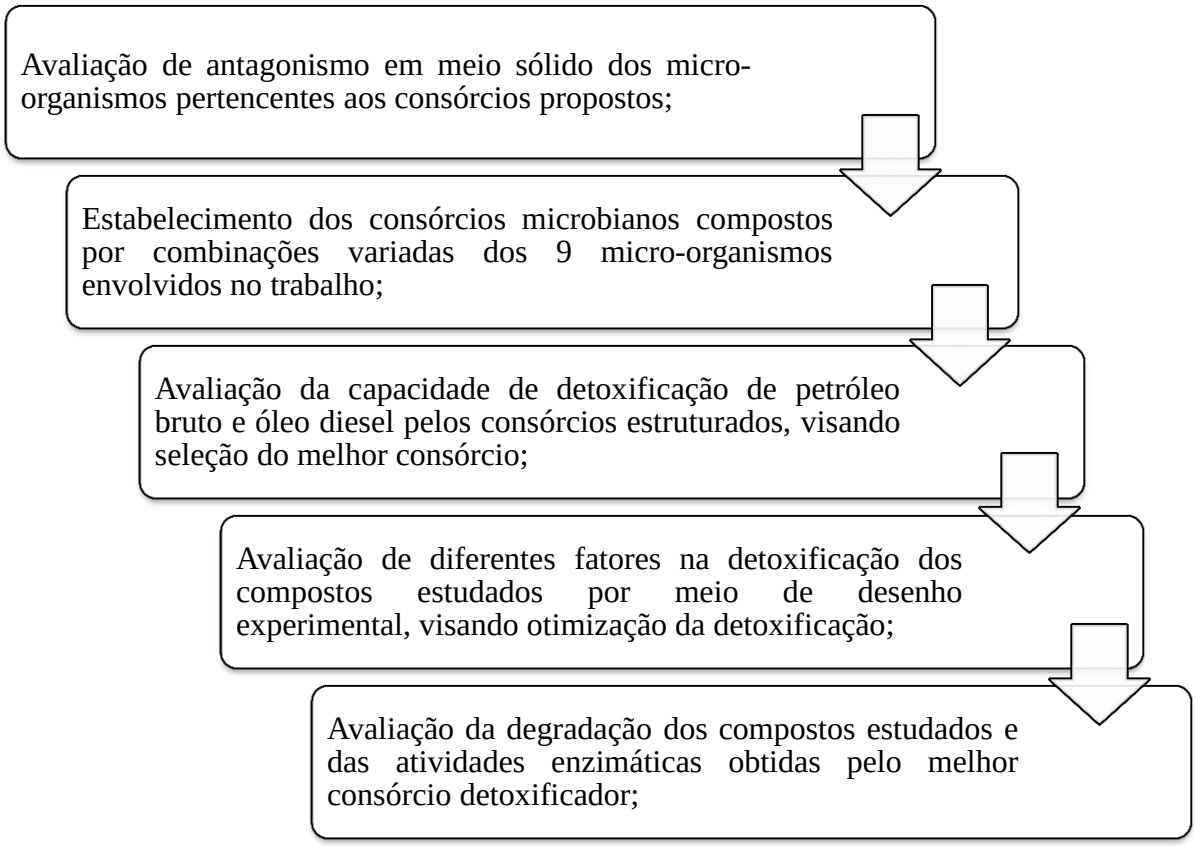
reprodutibilidade do resultado obtido, sendo necessária a repetição do experimento para garantir a estabilidade do processo. Posteriormente à realização do DCCR, é possível gerar um gráfico de superfície de resposta para obtenção de um modelo teórico que possibilita analisar e definir as faixas ótimas operacionais de cada variável (RODRIGUES & IEMMA 2009).

Zahed et al. (2010) determinaram a influencia de nutrientes na taxa de biodegradação de petróleo em água do mar artificial por bactérias isoladas de ambiente marinho utilizando DCCR e a metodologia de superfície de resposta. O estudo obteve, em 28 dias, 58,6% de redução na taxa de petróleo bruto diluído, em contraste com 53,3% obtidos nos experimentos que não passaram pelo processo de otimização. Em adição, em um estudo recente de degradação de corante têxtil por fungo de origem marinha (*Peniophora* sp. CBMAI 1063) o planejamento experimental foi eficientemente aplicado, resultando na descoloração de 94% do corante Preto Reativo 5 após 7 dias de cultivo em condição salina, sem produção de compostos mutagênicos e com uma redução de 57% no teor de carbono orgânico total (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Dessa forma, fica clara a importância da inserção de planejamentos experimentais em estudos de biorremediação de poluentes ambientais.

3. OBJETIVO

Avaliar o potencial biotecnológico de consórcios microbianos compostos por micro-organismos de origem marinha na detoxificação de amostras de petróleo bruto e óleo diesel.

3.1 Objetivos específicos



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Para a condução do presente trabalho foram utilizados 4 fungos ligninolíticos isolados de invertebrados marinhos da costa brasileira, 2 bactérias isoladas de reservatório de petróleo (*off-shore*), 2 leveduras lipolíticas marinhas da Antártica e 1 fungo marinho lipolítico da costa brasileira. Estes micro-organismos foram selecionados com base em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Durães Sette (UNESP/Rio Claro) e Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP), os quais demonstraram potencial dos mesmos para estudos de biorremediação. As descrições dos micro-organismos utilizados na constituição dos consórcios estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados referentes aos micro-organismos constituintes dos consórcios.

Micro-organismo	Fonte de isolamento	Propriedades	Referências
Fungos filamentosos			
Mucor racemosus CBMAI 847/CRM 336	*Mussismilia híspida* (cnidário)	Degradação de pireno e Bap Atividade ligninolítica	Passarini et al., 2011 Bonugli-Santos et al. 2010a
Aspergillus sclerotiorum CBMAI 849/CRM 348	*Palythoa variabilis* (cnidário)	Degradação de pireno e Bap Atividade ligninolítica	Passarini et al., 2011 Bonugli-Santos et al. 2010a
Cladosporium cladosporioides CBMAI 857/CRM 354	*Palythoa caribaeorum* (cnidário)	Degradação de pireno e Bap Atividade ligninolítica	Passarini et al., 2011 Bonugli-Santos et al. 2010a
Marasmiellus sp. CBMAI 1062/CRM 593	*Amphimedon viride* (esponja)	Produção de Lacase Atividade ligninolítica e descoloração de corante têxtil Degradação de pireno e Bap	Bonugli-Santos et al. 2010b Bonugli-Santos et al. 2011 Magrini 2012
Trichoderma harzianum CBMAI 1229/CRM 470	*Petromica citrina*	Lipolítico	Videira, 2014
Bactérias			
Bacillus sp. CBMAI 707	Petróleo altamente degradado	Degradação de fenantreno Produção de EPS	Vasconcellos et al., 2011
Dietzia sp. CBMAI 705	Petróleo altamente degradado	Degradação de *n*-octadecano e de fenantreno + *n*-octadecano	Vasconcellos et al., 2011
Leveduras			
Leucosporidium scotti CRM 728	Sedimento marinho da Antártica	Lipolítica	Duarte, 2014

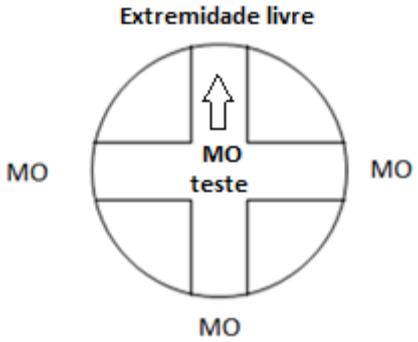
Cryptococcus laurentii CRM 707	Ouriço do mar da Antártica	Lipolítica	Duarte, 2014

Bap = Benzo[a]pireno

4.2 Teste de inibição dos micro-organismos

A capacidade dos micro-organismos em produzir composto antimicrobianos é conhecida e pode ser um fator limitante no estudo com consórcios microbianos. Dessa forma, testes de antagonismo foram realizados de forma preliminar à estruturação dos consórcios, com objetivo de verificar a possibilidade de ocorrência de inibições entre as linhagens constituintes. Para tal, foram utilizadas placas contendo meio Ágar Malte 2% (20 g L^{-1} de extrato de malte e 20 g L^{-1} de ágar), o qual foi cortado em formato de cruz e os micro-organismos foram inoculados nas extremidades de forma a permitir o crescimento próximo entre o micro-organismo teste inoculado ao centro, o qual pôde crescer isolado em uma extremidade livre para controle (Figura 5). As placas foram incubadas por 7 dias a 25 ^{o}C. Foram avaliadas as interações entre os três micro-organismos lipolíticos (*Leucosporidium scotti* CRM 728, *Cryptococcus laurentii* CRM 707 e *Trichoderma harziaunum* CBMAI 1229) e entre estes e os demais seis micro-organismos. Os testes somente com os micro-organismos não lipolíticos foram realizados no âmbito do Projeto de Doutorado de Gabriela Licursi Vieira (Fapesp 2012/12622-3 – UNESP/Rio Claro) e mostraram que não houve nenhum tipo de inibição entre eles.

Figura 5 - Esquema do teste de antagonismo realizado entre os micro-organismos que constituem os consórcios.



MO = Micro-organismo. Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Determinação da temperatura de incubação dos consórcios

Considerando que os micro-organismos selecionados para estruturar os consórcios no presente trabalho são provenientes de ambientes com condições de temperaturas muito

distintas, foi necessário determinar uma temperatura adequada ao crescimento de todos os micro-organismos envolvidos.

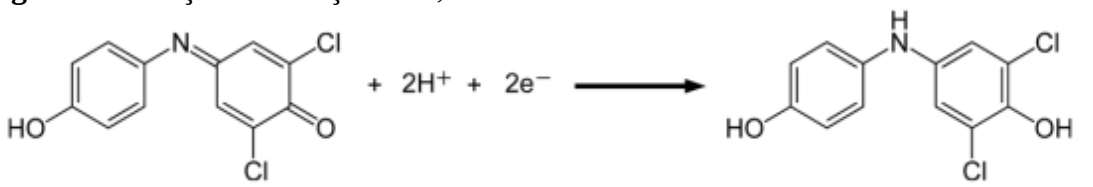
Todos os micro-organismos foram submetidos separadamente a ensaios a 20 ^{o}C, 25 ^{o}C e 28 ^{o}C em 50 mL de meio mineral Zinder (ZINDER et al., 1984) suplementado com glicose, por 7 dias a 150 rotações por minuto (rpm). O meio mineral suplementado (MMS) foi constituído por (em g L^{-1} de água destilada): NH_4Cl (1), K_2HPO_4 (0,4), $MgCl_2.6H_2O$ (0,1), Extrato de levedura (5), glicose (10) e solução de elementos traço (10 mL). A solução de elementos-traço continha (g L^{-1}): $FeCl_2.4H_2O$ (0,4), $MnCl_2.4H_2O$ (0,1), $CaCl_2.6H_2O$ (0,17), $CaCl_2$ (0,02), H_3BO_3 (0,019), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0,01), $NiCl_2.6H_2O$ (0,02) (ZEIKUS, 1977).

Para a inoculação dos fungos filamentosos nos testes, foram utilizados 2 cilindros de 5 mm de diâmetro de uma cultura de 7 dias crescida em meio Ágar Malte 2%, enquanto para bactérias e leveduras a inoculação foi realizada utilizando uma alçada da cultura de 48 h de crescimento em ágar nutriente (28 g L^{-1} do meio ágar nutriente) (bactérias) ou Ágar Malte 2% (leveduras). Após o período de incubação, a cultura resultante foi centrifugada a 13.664 × g por 20 min de forma a obter somente a massa celular dos micro-organismos, as quais foram secas em estufa a 105 ^{o}C por 18 h. Posteriormente, a biomassa foi pesada em balança analítica e o valor foi subtraído do peso do recipiente vazio que foi colocado nas mesmas condições de temperatura e tempo anteriormente citadas. Os testes foram feitos em duplicata e foi considerado os valores das médias dos ensaios.

4.4. Análise da degradação do óleo diesel utilizando DCPIP

Com o objetivo de realizar uma seleção prévia dos micro-organismos envolvidos nos consórcios que seriam capazes de degradar o óleo diesel isoladamente, utilizou-se a metodologia modificada de Hanson e colaboradores (1993), na qual o indicador redox 2,6 diclorofenol- indofenol (DCPIP) acusa a degradação do substrato através da mudança de coloração, sendo adicionado ao ensaio juntamente com o diesel como única fonte de carbono. A mudança de coloração do indicador DCPIP ocorre quando é reduzido, causando alteração na estrutura de sua molécula (Figura 6).

Figura 6 – Reação de redução do 2,6 Diclorofenol- indofenol.



2,6 Diclorofenol- indofenol 4-[(3,5-Diclorofenol)amino]fenol

Fonte: MONTAGNOLLI, R. N. *et al*. 2015.

O átomo de nitrogênio do centro da molécula atua como aceptor de elétrons e há a mudança da ligação dupla entre o nitrogênio e o carbono para uma ligação simples. Essa alteração na molécula do DCPIP faz com que ocorra a mudança de cor de azul escuro para incolor, o que pode ser usado como indicador de qualquer processo que ocorra a troca de elétrons, como a biodegradação (MONTAGNOLLI *et al.*, 2015)

Para a condução dos ensaios foi utilizado o meio Bushnell-Hass (BH), o qual foi constituído por (em g L^{-1} de água destilada): KH_2PO_4 (1), K_2HPO_4 (1), $NH_4H_2PO_4$ (1), $MgSO_4.7H_2O$ (0,01), $FeCl_2.4H_2O$(0,05), $CaCl_2.2H_2O$ (0,02). Para a inoculação dos fungos filamentosos foram utilizados 2 cilindros de 5 mm de diâmetro de uma cultura de 7 dias crescida em meio Ágar Malte 2%, e foram retirados os blocos com meio de cultura sólido, restando apenas a massa celular para inoculação. Para as bactérias, foi padronizada uma solução de DO = 0,4 e para leveduras DO =1,0 a 600 nm, a partir das quais 100 µL foram adicionados aos respectivos ensaios. Dessa forma, os testes foram estruturados com 7 mL do meio BH, 250 µL da solução de DCPIP a 1g/L, 50 µL de óleo diesel e o inóculo na quantidade supracitada. Os testes foram feitos em triplicatas, incubados a 25 ^{o}C por 7 dias a 150 rpm, sendo realizadas leituras visuais a cada 24 h e leitura em espectrofotômetro a 600 nm apenas no sétimo dia. A análise dos resultados foi realizada considerando os valores das médias dos ensaios. Para os ensaios com cada micro-organismo foram realizados testes controle sem o diesel como fonte de carbono e um controle sem inóculo para comparação com todos os ensaios.

4.5 Estabelecimento dos consórcios microbianos

Para o estabelecimento dos consórcios, foi levada em consideração a atuação conjunta dos micro-organismos com diferentes características, considerando os grupos taxonômicos dos fungos envolvidos (basidiomicetos, zigomicetos ou ascomicetos), a origem (local de isolamento) e as diferentes propriedades para potencial de atuação na biorremediação (Tabela 2). Além disso, foram incluídos em todos os consórcios pelo menos um produtor de lipase e

foram considerados os testes preliminares citados anteriormente. Dessa forma, dez consórcios foram estruturados visando a ação sinérgica entre os micro-organismos envolvidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Micro-organismos constituintes dos consórcios.

Micro-organismo	Código
(1) *Mucor racemosus*	CBMAI 847/CRM 336
(2) *Aspergillus sclerotiorum*	CBMAI 849/CRM 348
(3) *Cladosporium cladosporioides*	CBMAI 857/CRM 354
(4) *Marasmiellus* sp.	CBMAI 1062/CRM 593
(5) *Trichoderma harzianum*	CBMAI 1229/CRM 470
(6) *Bacillus* sp.	CBMAI 707
(7) *Dietzia* sp.	CBMAI 705
(8) *Leucosporidium scotti*	CRM 728
(9) *Cryptococcus laurentii*	CRM 707

1) 1 + 3 + 5;
2) 1 + 3 + 4 + 5;
3) 2 + 4 + 6 + 8;
4) 1 + 3 + 7 + 8;
5) 2 + 3 + 4 + 9;
6) 2 + 3 + 6 + 9;
7) 1 + 3 + 5 + 7 + 9;
8) 2 + 4 + 5 + 6 + 9;
9) 1 + 3 + 7 + 8 + 9;
10) 1 + 2 + 5 + 8 + 9;

4.6. Avaliação da capacidade de detoxificação do petróleo e óleo diesel pelos consórcios microbianos

Posteriormente à estruturação dos consórcios foram iniciados os ensaios para avaliação da capacidade de detoxificação do petróleo e óleo diesel. Para tal, foram realizadas pré-culturas dos fungos filamentosos a partir da inoculação de 2 cilindros de 5 mm de diâmetro de uma cultura de 7 dias crescida em meio Ágar Malte 2% em 10 mL de Meio Mineral Suplementado com glicose (MMS). O pré-inóculo foi incubado durante três dias a 25 ^{o}C e rotação de 150 rpm. As bactérias foram cultivadas em meio Agar Nutriente (NA) e incubadas por 48 h a 28 ºC, enquanto as leveduras foram cultivadas em meio Ágar Malte 2% e incubadas por 48 h a 20 ºC. Após o crescimento em placa, uma alçada da cultura foi transferida para 10 mL de MMS e então incubadas por 24 h a 25 ^{o}C e rotação de 150 rpm.

Os micro-organismos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de acordo com a construção dos consórcios e o volume de MMS foi completado para 50 mL. Para as bactérias,

foi padronizada uma solução de Densidade Óptica (DO) = 0,4 a 600 nm e para leveduras DO =1,0 a 600 nm, a partir das quais foram adicionados 1 mL aos consórcios correspondentes.

Posteriormente, foi adicionado aos ensaios 1% de petróleo bruto ou óleo diesel, esterilizados por autoclavagem e filtração em membrana de 0,22 µm, respectivamente. As amostras de petróleo bruto foram coletadas em maio de 2012, em um poço exploratório na Bacia de Campos (RJ) (Formação Quissamã) com profundidade entre 3.048-3063 m e temperatura *in situ* de 86 ^{o}C. A coleta foi realizada pela equipe técnica do CENPES/Petrobras no âmbito do projeto "Estruturação do Acervo de Pesquisa de Petróleo e Energia (APPE) da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/UNICAMP) e Coleção de Micro-organismos da Indústria do Petróleo (CMIP – Petrobras): caracterização, preservação e prospecção de micro-organismos provenientes de ambientes associados a petróleo" (Processo n°. 2012/000327-7), coordenado pela Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP). Já o diesel (S-10) foi obtido em um posto de combustível do município de Rio Claro (SP). Os frascos foram mantidos em incubadora com agitação a 25 ^{o}C e 150 rpm por um período de 14 e 21 dias. Além disso, foram preparados controles contendo: apenas o MMS; MMS e 1% do diesel ou petróleo estéril; os consórcios em MMS sem o diesel ou petróleo. Após o período de incubação, foram realizadas as análises descritas abaixo.

4.6.1 Determinação da biomassa dos consórcios após 14 e 21 dias de incubação

Com o objetivo de avaliar e comparar o crescimento dos consórcios microbianos na presença e ausência (controle) dos poluentes, as biomassas dos ensaios após 14 e 21 dias de incubação foram coletadas e analisadas. Os ensaios foram centrifugados a 13.664 × g por 20 min de forma a separar o caldo contendo o meio de cultura da massa celular dos micro-organismos, as quais foram secas em estufa a 105 ^{o}C por 18 h. Posteriormente, a biomassa foi pesada em balança analítica e o valor foi subtraído do peso do frasco vazio que foi colocado anteriormente nas mesmas condições de temperatura e tempo.

4.6.2 Análise da atividade enzimática de Lacase e Manganês peroxidase

Com o objetivo de realizar uma análise prévia da produção enzimática dos consórcios e tentar complementar os resultados de triagem do melhor consórcio detoxificador do diesel e do petróleo, foi realizada a avaliação da produção das enzimas Manganês peroxidase e lacase para os dez consórcios, de acordo com a metodologia de Wariishi et al. (1992) e Buswell et al. (1995), respectivamente.

A atividade da Lacase foi analisada em espectrofotômetro a 420 nm e utilizou-se o acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS) como substrato. A mistura foi composta de 0,3 mL de tampão acetato de sódio (0,1M e pH 5,0), 0,6 mL de caldo enzimático e 0,1 mL de solução ABTS a 0,03%. Os valores foram obtidos no tempo inicial (zero) e após dez minutos de reação a 37 ^{o}C.

A atividade de Manganês Peroxidase foi avaliada em espectrofotômetro a 270 nm e utilizou-se peróxido de hidrogênio (2Mm) como substrato. A mistura para reação foi composta de 0,8 mL de malonato de sódio (50Mm e pH 4,5), 0,05 mL de $MnSO_4$, 0,1 mL do caldo enzimático e 0,05 mL da solução de H_2O_2. Os valores foram obtidos no tempo inicial (zero) e após cinco e dez minutos de reação em temperatura ambiente.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. As atividades enzimáticas foram expressas em U L^{-1} do caldo enzimático e os cálculos foram realizados a partir da Equação 1, derivada da Lei de Beer-Lambert.

$$U\ L^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \varepsilon \times R \times t \qquad \textbf{(Equação 1)},$$

Onde:

ΔA = Diferença entre a absorbância final e a inicial
V = Volume da reação (0.001 L)
10^6 = Fator de conversão (de ε moles para µmoles)
ε = Coeficiente de extinção (M^{-1} cm^{-1})
R = Quantidade de caldo enzimático (L)
T = Tempo de reação (min)

4.6.3 Análise da toxicidade aguda em microtox

A técnica consiste na exposição da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri* a uma amostra, a qual acusa a toxicidade pela variação na quantidade luz emitida pela bactéria, sendo que a taxa de inibição de luz varia de acordo com o nível de toxicidade dos compostos. Para tanto, foi utilizado o equipamento Microtox 500, onde foi realizada uma suspensão inicial da bactéria liofilizada em tampão de reativação. Posteriormente, uma primeira diluição da bactéria foi feita, sendo 150 µL transferidos para 1500 µL de NaCl 2%. A partir dessa diluição, 100 µL foram transferidos para cubetas. A amostra, em um volume de 2500 µL foi adicionada em 250 µL de NaCl 22% e diluições seriadas de 1:1 foram realizadas. Para o controle utilizou-se NaCl 2%. As diluições foram transferidas para as cubetas contendo a bactéria. A leitura em luminômetro foi realizada em tempos de 0, 5, 15 e 30 minutos para as

amostras de 14 e 21 dias de cultivo. Os resultados da leitura da luminescência da bactéria *V. fischeri* foram avaliados em programa específico do equipamento Microtox 500 onde são gerados dados de dose-resposta e um EC_{50} pode ser determinado, o qual se caracteriza pela concentração efetiva do agente tóxico responsável pela redução de 50% da quantidade de luz emitida por *V. fischeri* após sua exposição ao agente por um período de tempo (CETESB, 2001).

Os ensaios com Microtox foram realizados somente para os consórcios incubados com diesel, devido à falta de material para prosseguir com os testes envolvendo petróleo, o alto custo para obtenção dos mesmos e a dificuldades que trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa encontraram com esse método. No entanto, as análises foram complementadas utilizando outro teste de avaliação da toxicidade das amostras (descrito abaixo).

4.6.4 Análise da toxicidade aguda com *Artemia* sp.

Para analisar a toxicidade dos consórcios incubados a 14 e 21 dias com diesel ou petróleo, cerca de 100 mg de ovos de *Artemia* sp. foram distribuídos em uma placa de Petri contendo água do mar artificial (ASW), a qual foi mantida sob iluminação constante, possibilitando a eclosão dos ovos após 48 h (Adaptado de VANHAECKE et al., 1981). O ASW foi constituído por (em g. 1,1 L^{-1} de água destilada): $MgCl_2.6H_2O$ (11,91), $CaCl_2.2H_2O$ (1,66), $SrCl_2.6H_2O$ (0,022), NaCl (26,319), Na_2SO_4 (4,409), KCl (0,745), $NaHCO_3$ (0,216), KBr (0,108), H_3BO_3 (0,029). Posteriormente, foram preparados tubos com 4,5 mL das amostras dos consórcios e 0,5 mL de NaCl 30% para ajuste osmótico do meio. Todas as amostras foram feitas em triplicata e testes com controle negativo (apenas MMS), controle positivo (MMS + poluente), controle apenas com ASW e controle de cada consórcio (consórcio + MMS) também foram realizados sob as mesmas condições.

Para a triagem dos consórcios, foram selecionados e colocados 10 náuplios de *Artemia* sp. em cada tubo e deixados por 24 h em exposição ao teste. Após este período, as larvas foram contadas em microscópio esterioscópico, levando em consideração a imobilidade dos náuplios como efeito tóxico. De acordo com os resultados obtidos, os ensaios que tiveram porcentagem de sobreviventes de *Artemia* sp. maiores que 20% foram selecionados e analisados estatisticamente por meta-análise com variação de proporções através do programa BioEstat 5.3, sendo considerados significativos os valores de q maiores ou iguais a 4,403 (α = 0.01).

4.7 Otimização da detoxificação do petróleo e óleo diesel pelo consórcio microbiano selecionado

Para dar início ao processo de otimização os fatores temperatura e agitação foram estabelecidos como variáveis fixas. Experimentos independentes foram realizados para que os valores dessas duas variáveis fossem fixados. Primeiramente, a variável temperatura teve seu ponto central estabelecido a 25°C, o nível inferior (-1) a 22°C e o superior (+1) a 28°C, todos sob agitação de 150 rpm e incubados por 21 dias. Foram avaliados os ensaios do consórcio com diesel ou petróleo e os seguintes controles: MMS, MMS com 1% do diesel ou petróleo estéril e consórcios em MMS sem o diesel ou petróleo.

Para a variável fixa agitação, estabelecemos o ponto central a 150 rpm, o nível inferior (-1) de 140 rpm e o superior (+1) a 160 rpm, todos sob temperatura de 25°C e incubados por 21 dias. Foram avaliados para a variável agitação os frascos contendo o consórcio na presença dos poluentes e os mesmos ensaios controle citados nos experimentos de temperatura. Após o período de incubação, os experimentos foram centrifugados a 13.664 × g por 20 min e a amostra obtida foi utilizada nos testes de toxicidade com *Artemia* sp.

Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e, uma vez que o número de ensaios desta etapa foi menor que do processo de triagem, o número amostral para os ensaios de detoxificação foi elevado para 30 náuplios de *Artemia* sp. por tubo, elevando a confiabilidade dos resultados. As larvas foram deixadas em exposição ao teste por 24 h, sendo analisados de forma semelhante aos testes com *Artemia* sp. citados anteriormente.

Posteriormente ao estabelecimento das condições de temperatura e agitação, o consórcio selecionado foi submetido a um planejamento do tipo Plackett–Burman (PB) para cada poluente, diesel e petróleo, a fim de avaliar a influência de diferentes variáveis na otimização da detoxificação/degradação desses compostos. Os testes foram realizados em 21 dias sob valor de temperatura e agitação estabelecidos *a priori* nos experimentos supracitados.

As variáveis independentes avaliadas para os ensaios com diesel e petróleo e suas respectivas quantidades estão descritas na Tabela 4, as quais foram determinadas com base em trabalhos realizados com otimização da degradação de petróleo (SHARMA & PANT, 2001; ZAHED et al., 2010; MOHAJERI et al., 2010; CELIK et al., 2008), diesel (HUANG et al., 2008) e HPA (MAGRINI, 2012). Todas as diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior, totalizando 20 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB20 em anexo (ANEXO A) (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Foram acrescentados à matriz quatro ensaios no ponto central para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Após o tempo de incubação, os ensaios foram

submetidos aos testes de toxicidade com *Artemia* sp., conforme metodologia já descrita anteriormente.

Tabela 4 – Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para o petróleo e óleo diesel.

Variável	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
1. Inóculo fúngico (cilindros de 5 mm)	2	3	4
2. Inóculo bacteriano (mL)	1	2	3
3. Inóculo da levedura (mL)	1	2	3
4. Poluente (% v/v)	1	1,5	2
5. Glicose (g/L)	0	5	10
6. Extrato de levedura (g/L)	0	2,5	5
7. Peptona (g/L)	0	1	2
8. Extrato de malte (g/L)	0	5	10
9. NH_4Cl (g/L)	0	1	2
10. K_2HPO_4 (g/L)	0	0,4	0,8
11. Tween 80 (mL)	0	0,5	1
12. Triton X-100 (mL)	0	0,5	1
13. pH	6	7	8
14. Salinidade (ASW%)	0	50	100

A partir dos resultados obtidos, um segundo planejamento do tipo PB foi realizado para avaliar doze das mesmas variáveis citadas na Tabela 4, totalizando 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB16 em anexo (ANEXO B) (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Foram acrescentados à matriz quatro ensaios no ponto central para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Após transcorrido o tempo de incubação, foram realizados os testes de toxicidade com *Artemia* sp. e os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

Após a fixação das variáveis nos pontos ótimos indicados pelos planejamentos anteriores, foi realizado um planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR) 2^2 com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, visando elaboração de modelo preditivo de resposta em função das variáveis independentes (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Após incubação a 21 dias, foram realizadas avaliações de toxicidade aguda utilizando *Artemia* sp., conforme descrito anteriormente, e os resultados foram analisados no software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

Os ensaios com os melhores resultados obtidos durante a condução do planejamento experimental com óleo diesel e petróleo foram validados e analisados. Para tal, foram feitos testes em triplicatas para análises em 7, 14 e 21 dias de incubação. Para todos os experimentos a biomassa dos consórcios foi medida de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Foram realizados testes de toxicidade aguda utilizando *Artemia* sp. e Microtox para todos os ensaios de validação, conforme metodologia já descrita.

Adicionalmente, foram realizadas análises de atividade enzimática para Lacase (BUSWELL et al. 1995), MnP (WARIISHI et al., 1992), conforme metodologia descrita no item 3.6.2, além da avaliação das enzimas LiP (ARORA & GILL, 2001) e lipase (YANG et al., 2002) para todos os ensaios validados.

4.8 Análise dos componentes presentes no petróleo bruto e óleo diesel por CG/EM

Para determinar alguns dos componentes presentes nas amostras de petróleo bruto e diesel utilizados no presente trabalho, foram realizadas análises cromatográficas em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Esta etapa do trabalho foi realizada com a colaboração do Dr. Adilson Sartoratto da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do CPQBA/UNICAMP. Para a análise das amostras, foi utilizado o cromatógrafo a gás Agilent HP-6890 acoplado ao detetor seletivo de massas HP-5975 e injetor automático HP 7683B operando no modo “splitless” com liner HP 5062-3587. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) sendo hélio o gás de arraste (1,0 $mL \cdot min^{-1}$). A temperatura do injetor foi de 280°C e do detetor foi de 310°C, com gradiente de temperatura para a coluna entre 50°C (2 minutos), 7°C/min e 310°C (20 minutos). As temperaturas da fonte de íons e do quadrupolo foram de 230ºC e 150°C, respectivamente. O detetor seletivo de massas operou a 70 Ev, m/z = 30 a 500 u.m.a. e o volume injetado foi de 1,0 mL/min. A identificação dos analitos foi feita pela comparação com a biblioteca eletrônica NIST e com dados da literatura.

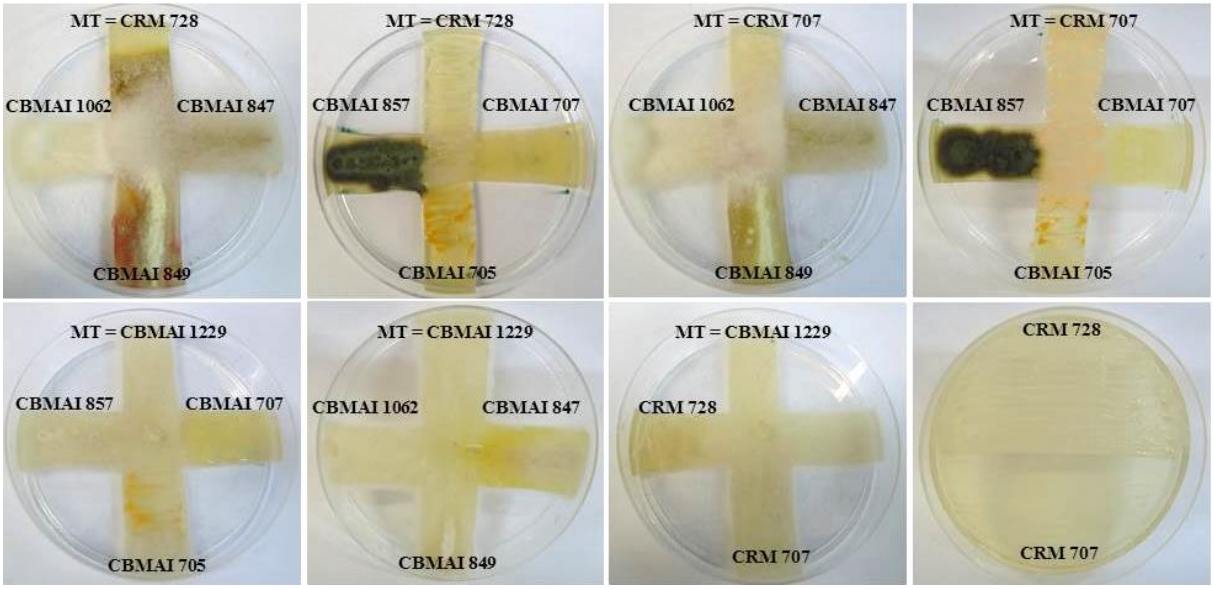
As análises foram realizadas para o petróleo e diesel antes da condução do bioprocesso (controle) e após a condução do bioprocesso utilizando o consórcio selecionado e as condições otimizadas validadas. Os poluentes foram extraídos das amostras utilizando o solvente hexano e a parte recuperada foi colocada em evaporador rotativo para obtenção das amostras concentradas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de inibição dos micro-organismos

Os resultados dos testes de inibição mostraram uma boa interação entre os micro-organismos selecionados, pois não foi observado halo de inibição em nenhum teste e houve sobreposição de crescimento das linhagens testadas (Figura 7). Sendo assim, a ausência de inibição entre os micro-organismos que agirão conjuntamente nos consórcios eliminou possíveis restrições para combinações microbianas estudadas.

Figura 7 – Resultados dos testes de antagonismo realizados com os micro-organismos que constituem os consórcios.



MT = Micro-organismo teste. CBMAI 847 = *Mucor racemosus*, CBMAI 849 = *Aspergillus sclerotiorum*, CBMAI 857 = *Cladosporium cladosporioides*, CBMAI 1062 = *Marasmiellus* sp., CBMAI 707 = *Bacillus* sp., CBMAI 705 = *Dietzia* sp., CRM 728 = *Leucosporidium scottii*, CRM 707 = *Cryptococcus laurentiii*, CBMAI 1229 = *Trichoderma harzianum*.

5.2 Determinação da temperatura de incubação dos consórcios

A eficiência da degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos é influenciada por fatores físicos, químicos e biológicos, os quais afetam o metabolismo e, consequentemente, o crescimento das espécies microbianas durante o processo de biodegradação (RIZZO et al., 2007). Dessa forma, devido às distintas origens dos micro-organismos envolvidos nos consórcios, a temperatura de incubação foi um fator importante a ser determinado.

A influência da temperatura na formação de biomassa dos micro-organismos foi notável, principalmente em alguns casos (Figura 8), mostrando que o método utilizado permitiu avaliar a atuação deste fator no crescimento dos micro-organismos estudados.

Figura 8 – Avaliação da biomassa dos micro-organismos sob diferentes temperaturas.

(a) Massa celular da levedura *C. laurentii* CRM 707 após incubação por 7 dias a 28°C (à esquerda) e a 20°C (à direita). (b) Massa celular do fungo *C. cladosporioides* CBMAI 857 após incubação por 7 dias a 28°C (à esquerda) e a 20°C (à direita).

A partir dos resultados obtidos foi possível notar que a temperatura de 25°C permitiu uma média de crescimento intermediária para todos os organismos (Tabela 5), se estabelecendo como uma condição de crescimento comum. Em alguns casos houve um pico de crescimento nesta temperatura, a saber: *M. racemosus* CBMAI 847 , *T. harziaunum* CBMAI 1229 e *Dietzia* sp. CBMAI 705. Dessa forma, a partir da análise de biomassa dos micro-organismos foi possível determinar a temperatura de 25°C como condição de incubação dos consórcios microbianos.

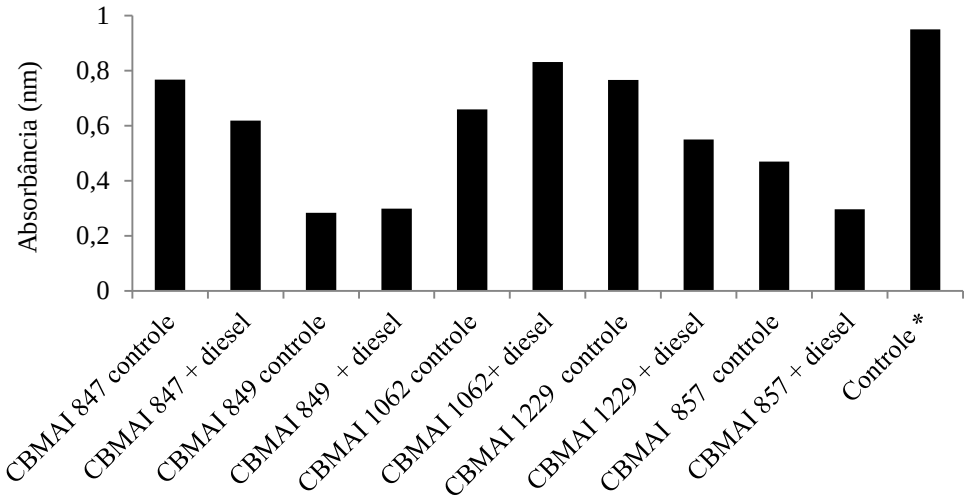
Tabela 5 – Valores de biomassa média após incubação dos consórcios a 20°C, 25°C e 28°C

	Biomassa média		
Micro-organismo	**20°C**	**25°C**	**28°C**
M. racemosus	0,21	0,25	0,19
A. sclerotiorum	0,29	0,24	0,20
T. harzianum	0,16	0,18	0,14
Marasmiellus sp.	0,26	0,27	0,43
C. cladosporioides	0,27	0,25	0,028
Bacillus sp.	0,045	0,038	0,075
Dietzia sp.	0,015	0,047	0,025
C. laurentii	0,34	0,33	0,13
L. scotii	0,2	0,16	0,15

5.3 Análise da degradação do diesel utilizando DCPIP

Após a coleta dos resultados dos ensaios com os fungos filamentosos, foi possível notar que houve ligeira degradação dos testes controle (meio BH + micro-organismo + DCPIP) em todos os experimentos. No entanto, *M. racemosus* CBMAI 847, *C. cladosporioides* CBMAI 857 e *T. harzianum* CBMAI 1229 obtiveram menor valor de absorbância nos ensaios com diesel do que em seus respectivos controle, demonstrando uma possível degradação do hidrocarboneto. Para *A. sclerotiorum* CBMAI 849 e *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 possivelmente ocorreu interação entre estes organismos e o DCPIP, pois os valores de absorbância dos testes controle foram menores do que os valores obtidos na presença de diesel. Para as bactérias e leveduras não houve resultados significativos para a degradação do diesel. A Figura 9 mostra os valores das médias de absorbância das triplicatas obtidas para os fungos filamentosos após os sete dias de incubação na presença do DCPIP.

Figura 9 – Média dos valores de absorbância dos ensaios de DCPIP com os fungos filamentosos após 7 dias de incubação.



*Controle = meio BH + DCPIP + diesel

O teste de análise de degradação do diesel utilizando o indicador DCPIP não se mostrou como uma metodologia satisfatória, pois não foram obtidos resultados coerentes para os ensaios controle. Considerando as propriedades dos micro-organismos aqui trabalhados, como por exemplo, capacidade de descoloração de corante têxtil, atividade ligninolítica e produção de lacase, há possibilidade de ter ocorrido produção de compostos capazes de interagir com o corante presente no indicador DCPIP. Além disso, principalmente nos ensaios com *Marasmiellus sp.* CBMAI 1062, foi observada a ocorrência de adsorção do corante junto

ao micélio, o que pode ter causado um falso resultado positivo na medição da absorbância (Figura 10).

Figura 10 – Réplicas do ensaio controle com *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 demonstrando a adsorção do corante ao micélio.

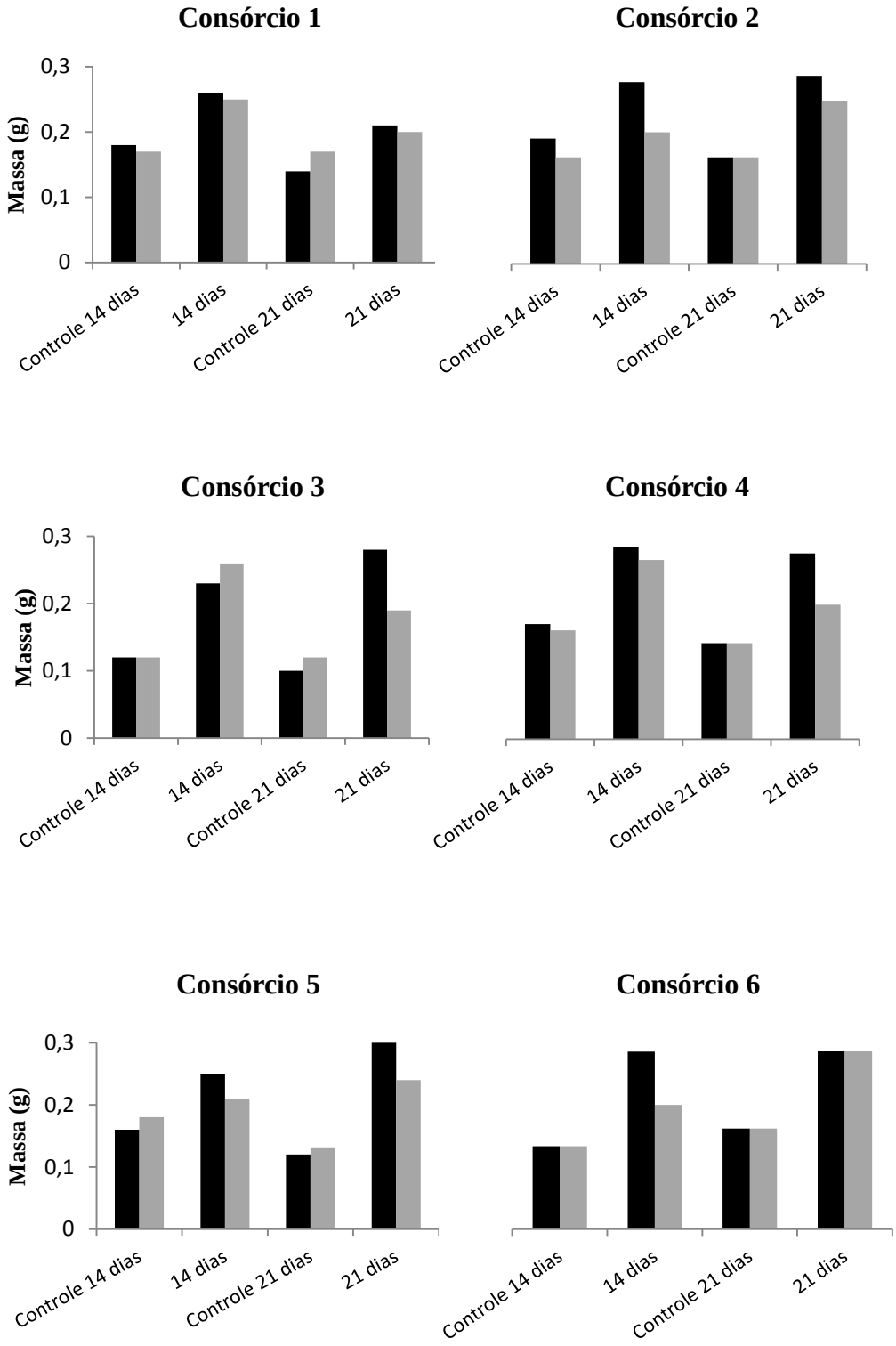
Em adição, como a massa celular dos fungos filamentosos foi retirada através da raspagem em meio ágar malte 2%, há ainda a possibilidade de que restos deste meio de cultura tenham permanecidos aderidos à massa fúngica, fazendo com que o consumo dessa fonte de carbono remanescente liberasse elétrons e reduzisse o indicador, fornecendo também possivelmente um resultado de falso-positivo. No caso das bactérias e das leveduras os resultados negativos podem indicar a incapacidade dessas linhagens de degradar o diesel de forma isolada, a necessidade de exposição ao ensaio por um período mais longo ou ainda a ausência de surfactantes que facilitem a degradação.

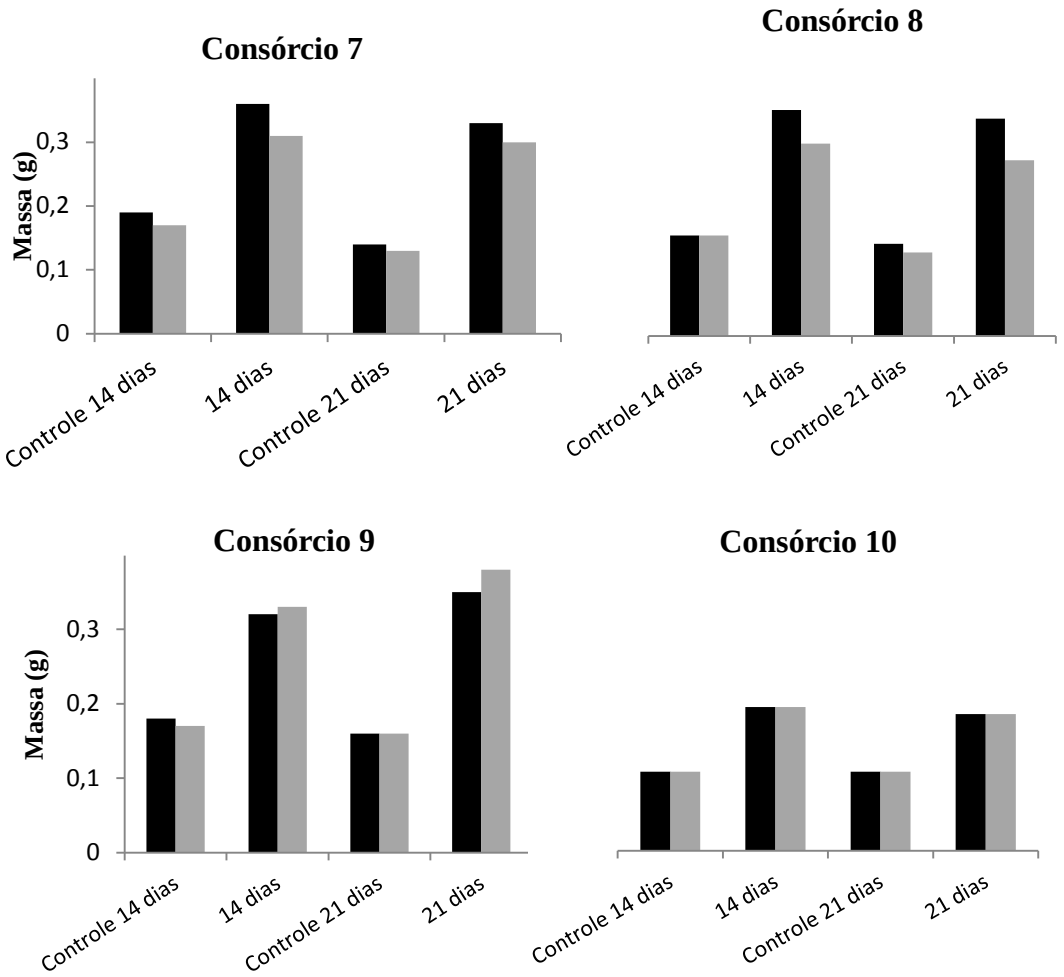
5.4 Avaliação da capacidade de detoxificação do petróleo e óleo diesel pelos consórcios microbianos

5.4.1 Determinação da biomassa dos consórcios após 14 e 21 dias de incubação

O crescimento microbiano pode ser afetado por inúmeros fatores, de forma que a biomassa de uma cultura microbiana pode refletir o grau de desenvolvimento e atividade metabólica dos micro-organismos envolvidos. Os resultados de mensuração da biomassa microbiana dos ensaios com diesel, petróleo e na ausência dos poluentes para todos os consórcios podem ser observados na Figura 11.

Figura 11 – Valores de biomassa obtidos para os dez consórcios microbianos após 14 e 21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm.





Ensaios realizados com diesel (■) e petróleo (■). Os ensaios controle (consórcio + MMS) não contém poluentes, mas foram incubados nas mesmas condições que os consórcios.
Consórcio 1: *M. racemosus* + *C. cladosporioides* + *T. harzianum*;
Consórcio 2: *M. racemosus* + *C. cladosporioides* + *Marasmiellus* sp. + *T. harzianum*;
Consórcio 3: *A. sclerotiorum* + *Marasmiellus* sp. + *Bacillus* sp. + *L. scotti*;
Consórcio 4: *M. racemosus* + *C. cladosporioides* + *Dietzia* sp. + *L. scotti*;
Consórcio 5: *A. sclerotiorum* + *C. cladosporioides* + *Marasmiellus* sp. + *C. laurentii*;
Consórcio 6: *A. sclerotiorum* + *C. cladosporioides* + *Bacillus* sp. + *C. laurentii*;
Consórcio 7: *M. racemosus* + *C. cladosporioides* + *T. harzianum* + *Dietzia* sp. + *C. laurentii*;
Consórcio 8: *A. sclerotiorum* + *Marasmiellus* sp. + *T. harzianum* + *Bacillus* sp. + *C. laurentii*;
Consórcio 9: *M. racemosus* + *C. cladosporioides* + *Dietzia* sp. + *L. scotti* + *C. laurentii*;
Consórcio 10: *M. racemosus* + *A. sclerotiorum* + *T. harzianum* + *L. scotti* + *C. laurentii*;

Para todos os ensaios foi verificado que os valores de biomassa foram menores nos testes controle (sem poluentes) do que naqueles em que foi adicionado 1% do diesel ou petróleo. Segundo Das & Chandran (2010) um dos principais caminhos para que ocorra a degradação aeróbia de hidrocarbonetos por micro-organismos envolve primeiramente um ataque por processo oxidativo e, posteriormente, os poluentes orgânicos são degradados através de caminhos periféricos, produzindo metabólitos intermediários. A síntese de

biomassa celular ocorre a partir dos precursores metabólitos centrais, como o piruvato ou acetil-CoA e da consequente produção de ATP no processo (DAS & CHANDRAN, 2010). Dessa forma, podemos inferir que, possivelmente, os micro-organismos dos consórcios utilizaram os poluentes como fonte de carbono adicional ao crescimento, indicando a ocorrência de interação com os hidrocarbonetos e possível biodegradação.

Com relação ao período de incubação, nota-se que os valores se mantiveram próximos para 14 e 21 dias na maioria dos ensaios, mostrando que o tempo possivelmente não influenciou diretamente o desenvolvimento de biomassa neste caso. De forma semelhante, também não houve diferença notável entre os valores de biomassa obtidos para os ensaios com diesel e petróleo, o que pode demonstrar que as diferenças estruturais e de complexidade desses poluentes não foi um fator limitante na produção de biomassa dos consórcios.

Além disso, as características morfológicas e fisiológicas dos micro-organismos podem ser responsáveis por diferenças na quantidade de biomassa apresentada por cada consórcio, uma vez que cada micro-organismo possui particularidades em relação ao tempo de incubação requerido para o desenvolvimento e produção de biomassa celular. Além disso, os consórcios 7, 8, 9 e 10 possuem um número maior de micro-organismos em sua constituição, o que pode refletir no volume de biomassa produzido, conforme podemos observar nos altos valores de biomassa para os consórcios 7 e 9.

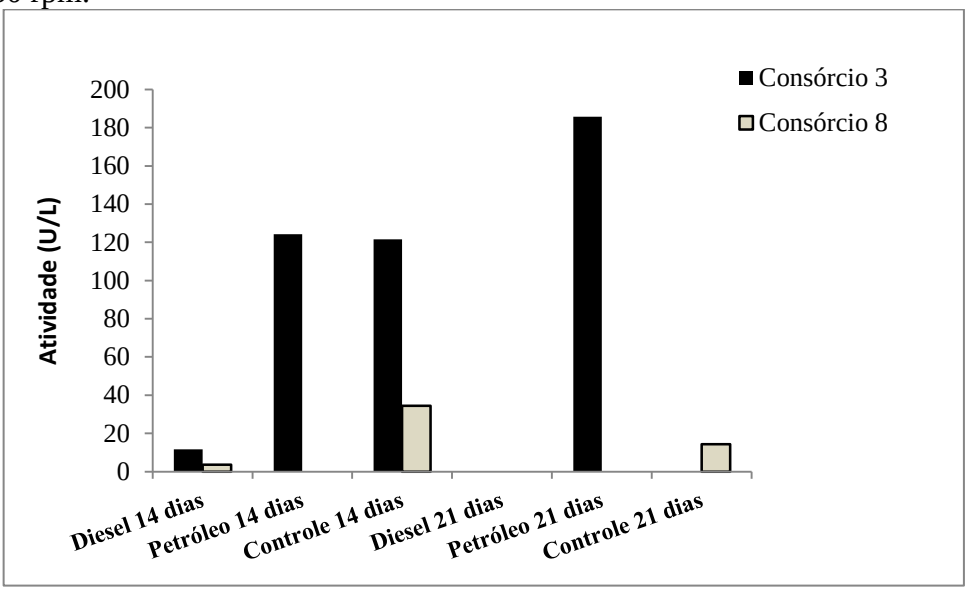
A degradação de hidrocarbonetos complexos por um conjunto de micro-organismos possibilita o desenvolvimento de um processo de sucessão entre as espécies constituintes do consórcio. Dessa forma, as condições do ambiente e os compostos disponíveis podem favorecer o crescimento de espécies diferentes ao longo do período de incubação (MALIK & AHMED, 2012; NKWELANG et al., 2008). Portanto, os resultados de biomassa apresentados também podem refletir as diferenças dos estágios de sucessão dentro das condições e constituições de cada consórcio.

5.4.2 Análise da atividade enzimática de Lacase e Manganês peroxidase

Com relação às atividades enzimáticas de lacase e MnP (Figura 12), as maiores atividades (entre 11,72 e 185,8 U/L) foram obtidas pelo consórcio 3, o qual apresentou atividade para lacase nos ensaios com petróleo em 14 e 21 dias e para os testes controle. Na presença de diesel esta enzima foi produzida apenas em 14 dias de incubação. O consórcio 8 também apresentou atividade para lacase (entre 3,62 e 34,5 U/L), principalmente nos ensaios controle. Outros consórcios que apresentaram atividade para a enzima lacase foram o

consórcio 5 (7,0 U/L) para o teste com diesel em 14 dias e o consórcio 2 (15,97 U/L), quando incubado com petróleo por 21 dias. Os consórcios que não foram citados não apresentaram atividade para esta enzima.

Figura 12 - Atividade da lacase (U/L) dos consórcios 3 e 8 após 14 e 21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm.



Nota-se que no consórcio 3 (somente para o diesel) e 8 a atividade enzimática foi maior nos testes controle do que nos ensaios com os poluentes. Esta aparente inibição da produção de lacase pela presença do diesel ou petróleo pode ocorrer devido à utilização de outra via metabólica para degradação de estruturas presentes neste composto, como a P450 monoxigenase que já foi reportada no metabolismo de fungos capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SYED et. al, 2010).

No entanto, para o consórcio 3 observa-se ainda que a atividade enzimática é maior no ensaio com petróleo do que para os ensaios controle e os consórcios 2 e 5 só apresentaram atividade nos ensaios com poluentes. Nestes casos, possivelmente a presença do contaminante estimulou a produção de lacase, a qual pode ter sido utilizada na metabolização do composto. Além disso, exceto para os ensaios com petróleo do consórcio 3, verifica-se que há queda ou ausência de atividade de lacase nos testes incubados por 21 dias. Tal fato pode estar relacionado com um possível ataque proteolítico resultante do consumo de substratos e depleção de nutrientes do meio após este período de incubação mais longo, conforme já sugerido por Puri et al. (2002). No entanto, para os ensaios com petróleo do consórcio 3 observamos um aumento da produção da enzima de 14 para 21 dias de incubação.

Os fungos basidiomicetos são primariamente encontrados em processos de deterioração da madeira e possuem uma capacidade ligninolítica mais ampla do que os ascomicetos, apesar de pesquisas demonstrarem capacidade desses últimos em degradar materiais lignocelulósicos (GAO et al., 2011; SHARY et al., 2007). O fato de apenas os consórcios 2, 3, 5 e 8 apresentarem atividade para lacase pode estar relacionado à composição dos consórcios, já que todos eles possuem o fungo basidiomiceto *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, que já é conhecido pela capacidade de produção de enzimas ligninolíticas, incluindo a lacase (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

Com relação à manganês peroxidase, não foi observada atividade enzimática em nenhum dos ensaios dos dez consórcios. Tal fato permite inferir que a rota metabólica utilizada pelos micro-organismos em uma possível degradação dos poluentes não envolve esta enzima.

Resultados semelhantes aos apresentados foram encontrados por Mabrouk et al. (2010) ao estudar a produção de enzimas ligninolíticas por sete fungos marinhos e observar apenas atividade para lacase, enquanto nenhuma atividade foi detectada para MnP. Outros trabalhos reportados em literatura demonstraram que a lacase foi a única enzima ligninolítica com atividade detectada quando fungos foram crescidos em meio líquido (HOU et al., 2004) ou mesmo quando incubados com HPAs (WU et al., 2010). A produtividade das enzimas do sistema ligninolítico pode ser influenciada por fatores como composição do meio de cultura ou pelo nível de complexidade da estrutura do composto, conforme verificado por Wu et al. (2010) ao obter produções de lacase significativamente diferentes por um fungo isolado de sedimento de mangue em meios com diferentes HPAs como única fonte de carbono. De forma semelhante, no presente estudo a alta produção de lacase pelo consórcio 3 somente quando incubado com petróleo pode ser explicada pela diferença de complexidade na estrutura desses hidrocarbonetos e, portanto, mostrando que o petróleo pode ser um substrato mais indutor para a produção desta enzima quando comparado ao diesel.

5.4.3 Análise da toxicidade aguda em microtox

Os ensaios com Microtox foram realizados somente para os consórcios incubados com diesel, conforme justificado anteriormente. Os valores de EC_{50} obtidos para todos os consórcios e controles negativo e positivo, incubados a 14 e 21 dias, em 30 minutos de exposição à bactéria *V. fischeri* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (intervalo de confiança de 95%) em 30 minutos de exposição aos ensaios contendo diesel (21 dias de incubação a 25ºC e 150 rpm).

	EC_{50}(%) – 30 minutos	
Amostra	**14 dias**	**21 dias**
Controle negativo	119,6	119,2
Controle positivo	6,479	2,387
Consórcio 1	0,9819	2,982
Consórcio 2	3,36	3,691
Consórcio 3	1,067	3,004
Consórcio 4	2,337	0,4055
Consórcio 5	1,129	1,43
Consórcio 6	3,201	15,99
Consórcio 7	0,7876	0,6336
Consórcio 8	0,6447	2,119
Consórcio 9	0,3211	0,7614
Consórcio 10	2,162	1,725

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam alto valor de EC_{50} para o controle negativo (constituído apenas do MMS) e baixo EC_{50} para o controle positivo (MMS + 1% diesel), conferindo coerência ao teste devido à clara diferença de toxicidade entre os ensaios controle. Além disso, os resultados mostram que exceto para o consórcio 6 incubado a 21 dias, a maioria das amostras apresentaram um valor de EC_{50} menor do que a do controle positivo, permitindo inferir que a possível degradação do diesel gerou compostos intermediários mais tóxicos do que sua estrutura original. No entanto, o consórcio 6 incubado por 21 dias mostrou um aumento no valor do EC_{50} de aproximadamente 6,7 vezes em relação ao controle positivo, demonstrando ser um potencial detoxificador do poluente estudado.

5.4.4 Análise da toxicidade aguda com *Artemia* sp.

As porcentagens de sobreviventes dos náuplios de *Artemia* sp. para cada teste está descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios contento diesel e petróleo (média das triplicatas).

Amostra		**% sobreviventes-14 dias**	**% sobreviventes-21 dias**
Controle	MMS	86	86
	MMS + diesel	0	0
	MMS + pet.	13	13
Consórcio 1	Diesel	6	0
	Petróleo	0	30
	Controle*	76	86
Consórcio 2	Diesel	23	20
	Petróleo	13	0
	Controle	86	96
Consórcio 3	Diesel	10	0
	Petróleo	16	3
	Controle	93	93
Consórcio 4	Diesel	0	0
	Petróleo	0	3
	Controle	93	93
Consórcio 5	Diesel	6	0
	Petróleo	43	16
	Controle	100	100
Consórcio 6	Diesel	0	46
	Petróleo	30	60
	Controle	80	83
Consórcio 7	Diesel	0	0
	Petróleo	0	0
	Controle	100	76
Consórcio 8	Diesel	10	0
	Petróleo	16	36
	Controle	93	83
Consórcio 9	Diesel	0	0
	Petróleo	3	20
	Controle	93	83
Consórcio 10	Diesel	3	6
	Petróleo	10	16
	Controle	80	73

Controle* = Consórcio + Meio Mineral
Pet. = Petróleo

Os resultados apresentados na Tabela 7 demonstram que a maioria dos consórcios apresentou baixos valores de sobreviventes de larvas de *Artemia* sp., os quais foram eliminados da triagem de possíveis detoxificadores. Porém, aqueles ensaios que tiveram porcentagem de sobreviventes de *Artemia* sp. maiores que 20% foram analisados

estatisticamente por meta-análise com variação de proporções utilizando o programa BioEstat 5.3, sendo considerados significativos os valores de *q* maiores ou iguais a 4,403 ($\alpha = 0.01$). Os resultados estatísticos das amostras selecionadas estão apresentados na Tabela 8.

De acordo com os dados obtidos, podemos concluir que nenhum dos consórcios analisados produziram metabólitos tóxicos na ausência dos poluentes, já que quando comparados os valores dos ensaios controle de cada consórcio e do controle negativo, todos apresentaram valores de *q* abaixo do valor crítico para $\alpha = 0.01$, mostrando que não houve diferença significativa ou que esta diferença se deu apenas ao nível de 95% de probabilidade entre estes ensaios.

O consórcio 1 com petróleo (21 dias) e o consórcio 6 com petróleo (14 dias) não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle positivo, que contem apenas o meio mineral e o petróleo. Esses resultados indicam que estes consórcios não foram capazes de detoxificar as amostras, já que tiveram dados estatísticos semelhantes ao ensaio que não foi submetido a nenhum tratamento.

Cabe destacar que não houve diferença estatística significativa entre o ensaio do consórcio 6 com petróleo (21 dias) e o controle deste consórcio sem poluente. Além disso, quando comparamos este mesmo consórcio incubado pelo mesmo período com o diesel e o controle do consórcio, notamos que não houve diferença significativa ao nível de 99% de probabilidade ($p<0.01$), mas somente para 95% ($p<0.05$), indicando maior proximidade da hipótese de nulidade, apesar de ainda ser uma proporção com diferença estatística significativa. Tais dados corroboram os resultados de toxicidade encontrados nos testes com *Vibrio fischeri*, já que o mesmo consórcio foi o que apresentou o resultado mais promissor também para os ensaios com o diesel em Microtox.

Para todos os outros consórcios analisados observamos que houve diferença significativa entre todas as comparações ($p<0.01$ ou $p<0.05$) e, portanto, não foram considerados potenciais detoxificadores de petróleo ou diesel.

O processo de triagem realizado nesta fase do trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos dez consórcios microbianos em detoxificar as amostras de petróleo bruto e óleo diesel. Dessa forma, apesar dos resultados de produção de enzima terem sido melhores para os consórcios 3 e 8, e a maior produção de biomassa ter sido obtida para os consórcios 7 e 9, o consórcio 6 foi o selecionado para seguir nas próximas etapas do presente trabalho devido ao maior potencial de detoxificação de poluentes ambientais.

Tabela 8 – Comparações estatísticas das proporções dos ensaios de toxicidade para os consórcios que apresentaram número de larvas vivas de *Artemia* sp. maiores que 20%.

	C1 + pet / 21 d		**C2 + die / 14 d**		**C5 + pet / 14 d**		**C6 + die / 21 d**		**C6 + pet / 14 d**		**C6 + pet / 21 d**		**C8 + pet / 21 d**	
	q	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**
Proporções 1 e 2	2,1665	ns	4,6794	< 0.01	3,648	< 0.05	73,196	< 0.01	2,1665	ns	5,439	< 0.01	4,955	< 0.01
Proporções 1 e 3	6,5589	< 0.01	7,3596	< 0.01	5,078	< 0.01	4,7194	< 0.01	6,5589	< 0.01	6,6	< 0.01	11,3	< 0.01
Proporções 1 e 4	6,5589	< 0.01	7,3596	< 0.01	8,391	< 0.01	4,2328	< 0.05	5,6201	< 0.01	2,8	ns	12,58	< 0.01
Proporções 2 e 3	8,7254	< 0.01	12,039	< 0.01	8,725	< 0.01	12,039	< 0.01	8,7254	< 0.01	12,04	< 0.01	16,25	< 0.01
Proporções 2 e 4	8,7254	< 0.01	12,039	< 0.01	12,04	< 0.01	11,553	< 0.01	7,7866	< 0.01	8,239	< 0.01	17,53	< 0.01
Proporções 3 e 4	0	ns	0	ns	3,314	ns	0,4865	ns	0,9388	ns	3,8	< 0.05	1,277	ns

C1, C2, C5, C6, C8: Consórcios 1, 2, 5, 6 e 8, respectivamente;
die: diesel; pet: petróleo; 14 d: 14 dias; 21d: 21 dias; ns: não significativo
1- Ensaio dos consórcios com os poluentes; 2- Controle positivo (MM + diesel / petróleo); 3- Controle negativo (apenas MM); 4- Controle do consórcio (Consórcio sem o poluente);
Valor crítico (0.05) = 3,633; Valor crítico (0.01) = 4,403

5.5 Otimização da detoxificação do petróleo e óleo diesel pelo consórcio microbiano selecionado

Com o objetivo de avaliar a influencia das condições de cultivo na detoxificação/degradação do diesel e do petróleo e determinar as condições ótimas para que este processo ocorra, o consórcio 6 constituído pelos micro-organismos A. *sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus* sp. CBMAI 707 e *C. laurentii* CRM 707, incubado a 21 dias, foi submetido ao planejamento experimental. Esta abordagem possibilita reduzir custo e tempo e elevar a produtividade dos testes fazendo uso de ferramentas estatísticas (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

5.5.1 Determinação das condições de temperatura e agitação

Os resultados dos experimentos iniciais para determinação das melhores condições de temperatura e agitação estão descritos na Tabela 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9 - Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de otimização da temperatura.

Amostra		% sobreviventes-21 dias		
		22°C	25°C	28°C
Controle	MMS	90	92,2	90
	MMS + diesel	10	7,77	10
	MMS + petróleo	15,5	16	15,5
Consórcio 6	Diesel	2,5	34	76,56
	Petróleo	32,9	40	20,35
	Controle	90	95,5	94,4

Tabela 10 - Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de otimização da agitação.

Amostra		% sobreviventes-21 dias		
		140 rpm	150 rpm	160 rpm
Controle	MMS	98,8	92,2	98,8
	MMS + diesel	13,3	7,7	13,3
	MMS + petróleo	2,2	16	2,2
Consórcio 6	Diesel	37,7	34	79,4
	Petróleo	28,8	40	18,8
	Controle	96,6	95,5	91,1

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que os ensaios controle conferem coerência aos testes, já que observamos alta porcentagem de sobreviventes para os controles na ausência dos poluentes e baixos valores para os controles com diesel ou petróleo.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram um aumento de sobreviventes das larvas de *Artemia* sp. para os ensaios a 28°C com diesel, o que indica a influência da temperatura no metabolismo dos micro-organismos estudados para a degradação deste composto e, portanto, o estabelecimento de um fator importante para o processo de otimização da detoxificação. De maneira distinta, os ensaios com petróleo mantiveram um maior número de larvas de *Artemia* sp. vivas a 25°C. Estes resultados sugerem que a diferença estrutural entre os dois poluentes pode estar influenciando as rotas metabólicas e produtos metabólicos formados pelos micro-organismos durante a degradação, bem como a ação individual dos micro-organismos constituintes do consórcio.

Com relação aos dados obtidos para os ensaios de agitação, observamos um maior número de sobreviventes de náuplios de *Artemia* sp. para os ensaios com diesel a 160 rpm, demonstrando a influência também desse fator na capacidade de metabolização do poluente pelos micro-organismos do consórcio. Para os ensaios com petróleo, manteve-se um maior número de larvas de *Artemia* sp. vivas a 150 rpm, demonstrando novamente que possivelmente as diferenças estruturais desses poluentes interferem nas condições adequadas para detoxificação/degradação.

Os resultados foram avaliados estatisticamente por meta-análise com variação de proporções através do programa BioEstat 5.3 e estão descritos na Tabela 11 e 12. Foram considerados significativos os valores de *q* maiores ou iguais a 4,403 ($\alpha = 0.01$).

De acordo com as Tabelas 11 e 12, podemos inferir que para estes ensaios também não houve produção de metabólitos tóxicos na ausência dos poluentes, uma vez que não houve diferença significativa entre os ensaios controle do consórcio e o controle negativo ou que esta diferença se deu apenas ao nível de 95% de probabilidade entre estes ensaios.

A partir dos dados da Tabela 11, podemos notar que quando o consórcio 6 foi incubado com o diesel a 22°C e com petróleo a 28°C não houve diferença significativa quando comparado com o controle positivo, indicando claramente a influência da temperatura na eficiência de degradação dos poluentes pelos consórcios. O consórcio 6 incubado com diesel a 28°C não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle negativo, mostrando um aumento da detoxificação com o aumento da temperatura. Para todos os outros ensaios analisados houve diferença significativa entre todas as comparações ($p<0.01$

ou $p<0.05$), mostrando que nestes casos a temperatura não afetou a detoxificação a nível estatisticamente significativo.

Dessa forma, quando relacionamos os dados da Tabela 9 e 11, podemos concluir que a temperatura que permitiu melhor detoxificação pelo consórcio 6 quando incubado com diesel por 21 dias foi a de 28°C, enquanto para o petróleo foi a de 25°C. Estes dados corroboram os estudos de Sharma & Pant (2001), que afirmam que a biodegradação do petróleo normalmente ocorre em temperaturas de 25°C a 33°C, já que a baixas temperaturas a viscosidade do óleo aumenta e a volatilidade de compostos tóxicos decai, resultando numa diminuição da biodegradação.

Com relação aos dados apresentados na Tabela 12, observamos que não houve diferença significativa entre os valores do consórcio 6 incubado com diesel a 160 rpm e o controle do consórcio sem o poluente, demonstrando um aumento da detoxificação com o aumento da agitação. No entanto, houve diferença significativa entre todos os outros ensaios envolvendo essa variável, de forma que a agitação não influenciou a detoxificação a nível estatisticamente significativo para estes casos. Assim, quando comparamos as Tabelas 10 e 12, é possível estabelecer uma melhor condição a 160 rpm para o ensaio com diesel e, apesar de não ter obtido dados estatisticamente significativos para os ensaios com petróleo, os resultados apresentados na Tabela 10 permitem o estabelecimento de 150 rpm como a melhor condição de agitação para os testes com este poluente.

Tabela 11 – Comparações estatísticas das proporções dos testes de toxicidade para os ensaios em diferentes temperaturas.

	C6 + die / 22°C		C6 + pet / 22°C		C6 + die / 25°C		C6 + pet / 25°C		C6 + die / 28°C		C6 + pet / 28°C	
	q	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**
Proporções 1 e 2	2.511	ns	3.7124	< 0.05	6.4292	< 0.01	4.9546	< 0.01	13.9691	< 0.01	1.0873	ns
Proporções 1 e 3	19.8787	< 0.01	15.2066	< 0.01	12.3793	< 0.01	11.2983	< 0.01	3.3986	ns	17.8317	< 0.01
Proporções 1 e 4	19.8787	< 0.01	12.1018	< 0.01	13.6561	< 0.01	12.5750	< 0.01	4.9348	< 0.01	13.7623	< 0.01
Proporções 2 e 3	17.3677	< 0.01	18.9190	< 0.01	18.8086	< 0.01	16.2528	< 0.01	17.3677	< 0.01	18.9190	< 0.01
Proporções 2 e 4	17.3677	< 0.01	15.8143	< 0.01	20.0853	< 0.01	17.5296	< 0.01	18.9039	< 0.01	14.8496	< 0.01
Proporções 3 e 4	0.00	ns	3.1048	ns	1.2767	ns	1.2767	ns	1.5362	ns	4.0695	< 0.05

die: diesel; pet: petróleo; ns: não significativo

1- Ensaio dos consórcios com os poluentes; 2- Controle positivo (MMS + diesel / petróleo); 3- Controle negativo (apenas MMS); 4- Controle do consórcio (Consórcio sem o poluente);

Valor crítico (0.05) = 3,633; Valor crítico (0.01) = 4,403

Tabela 12 – Comparações estatísticas das proporções dos testes de toxicidade para os ensaios em diferentes valores de agitação.

	C6 + die / 140rpm		C6 + pet / 140rpm		C6 + die / 150rpm		C6 + pet / 150rpm		C6 + die / 160rpm		C6 + pet / 160rpm	
	q	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**	**q**	**p-valor**
Proporções 1 e 2	7.0915	< 0.01	7.6909	< 0.01	6.4292	< 0.01	4.9546	< 0.01	13.5050	< 0.01	5.4830	< 0.01
Proporções 1 e 3	13.1539	< 0.01	16.6240	< 0.01	12.3793	< 0.01	11.2983	< 0.01	6.7404	< 0.01	18.8319	< 0.01
Proporções 1 e 4	11.8225	< 0.01	15.2925	< 0.01	13.6561	< 0.01	12.5750	< 0.01	3.2486	ns	15.3401	< 0.01
Proporções 2 e 3	20.2455	< 0.01	24.3149	< 0.01	18.8086	< 0.01	16.2528	< 0.01	20.2455	< 0.01	24.3149	< 0.01
Proporções 2 e 4	18.9140	< 0.01	22.9835	< 0.01	20.0853	< 0.01	17.5296	< 0.01	16.7536	< 0.01	20.8231	< 0.01
Proporções 3 e 4	1.3315	ns	1.3315	ns	1.2767	ns	1.2767	ns	3.4918	ns	3.4918	ns

die: diesel; pet: petróleo; ns: não significativo

1- Ensaio dos consórcios com os poluentes; 2- Controle positivo (MMS + diesel / petróleo); 3- Controle negativo (apenas MMS); 4- Controle do consórcio (Consórcio sem o poluente);

Valor crítico (0.05) = 3,633; Valor crítico (0.01) = 4,403

5.5.2 Planejamento do tipo Plackett–Burman

Após a determinação das condições de temperatura e agitação, o consórcio 6 foi submetido a um planejamento do tipo Plackett–Burman (PB) para cada poluente (diesel e petróleo), a fim de avaliar a influência de quatorze variáveis (Tabela 4, Materiais e Métodos) na otimização da detoxificação/degradação desses compostos. Após a incubação dos ensaios por 21 dias, as amostras foram coletadas e os testes de toxicidade com *Artemia* sp. foram realizados.

Os resultados de toxicidade com *Artemia* sp. para os testes com diesel mostraram mortalidade total dos náuplios em 22 ensaios de um total de 24 (incluindo os pontos centrais). Apenas os ensaios 14 e 20 apresentaram sobreviventes (81% e 52,2%, respectivamente). Além disso, no momento da contagem foi possível observar que as larvas de *Artemia* sp. se apresentavam escuras e deformadas. Uma vez que os dois ensaios que apresentaram sobreviventes não continham nenhum tipo de detergente, podemos inferir que houve interação entre estas substâncias (Tween 80 e Triton X-100) e os organismos, tendo possivelmente ocorrido lise da membrana celular através da interação com seus principais componentes, como lipídeos e proteínas, conforme reportado por Romanelli et al. (2006). Deese et al. (2015) avaliaram o efeito de três surfactantes em ambientes aquáticos analisando a toxicidade desses compostos em *Artemia franciscana* e verificaram que o Triton X-100 teve um efeito significante na taxa de mortalidade desse microcrustáceo. A análise estatística não foi realizada para estes testes, já que os resultados dos ensaios foram muito semelhantes. Dessa forma, um segundo planejamento PB foi realizado sem os detergentes Tween 80 e Triton X-100, totalizando 12 variáveis.

Os resultados de toxicidade com *Artemia* sp. no segundo planejamento do tipo PB estão descritos na Tabela 13. Nos experimentos com diesel, oito ensaios apresentaram mais de 50% de sobreviventes de *Artemia* sp., sendo que o ensaio 4 foi selecionado para comparação com os resultados estatísticos, uma vez que este foi o teste com maior número de sobreviventes de *Artemia* sp. (83,3%) onde a concentração de poluente se encontrava no nível superior (ANEXO B). Para os testes com petróleo, quatro ensaios apresentaram porcentagem de sobreviventes acima de 50%, com destaque para o ensaio 13 (76,6%), que foi selecionado como o melhor resultado com este poluente. Nota-se que para ambos diesel e petróleo, os valores de sobreviventes dos pontos centrais foram baixos, o que possivelmente pode ter sido acarretado devido à presença de todas as variáveis e, portanto, à alta disponibilidade de fonte de carbono além dos hidrocarbonetos de petróleo ou diesel, não possibilitando a ação dos micro-organismos para a degradação/detoxificação. Para as análises de desvio padrão, foram

considerados três ensaios dos pontos centrais para cada poluente, sendo um descartado do planejamento de cada poluente, por apresentar valores distantes dos outros três. Foram obtidos os valores de 1,90 para o planejamento com óleo diesel e 3,86 para o petróleo, demonstrando pequena variação dos dados. Os dados estatísticos obtidos pelo software STATISTICA 7.0 estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios do planejamento PB16 contendo diesel e petróleo.

Ensaio	% sobreviventes – diesel	% sobreviventes – petróleo
1	0	7
2	86,6	57,7
3	27,7	14,4
4	83,3	70
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	53,3	67,7
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	64,4	26,6
13	84,4	76,6
14	77,7	10
15	78,8	31,1
16	82,2	61,1
17	3,3	10
18	0	17,7
19	0	13,3

Tabela 14 – Melhores ensaios obtidos para os testes com diesel e petróleo e análise estatística do planejamento de PB sobre o processo de detoxificação dos poluentes.

	Diesel			Petróleo		
Fator	**Valor E4**	**Efeito**	**p-valor**	**Valor E13**	**Efeito**	**p-valor**
IF	4 cilindros	-0,9750	0,9519	2 cilindros	8,0750	0,4430
IB	3 mL	-9,3000	0,5711	3 mL	1,9000	0,8531
IL	3 mL	-19,3000	0,2603	1 mL	-12,2500	0,2593
Poluente	2%	-23,1750	0,1862	1%	-20,8500	0,0783[a]
Glicose	0	-29,2750	0,1083[a]	10 g L^{-1}	-8,3000	0,4310
EL	0	-4,3000	0,7911	5 g L^{-1}	0,2250	0,9824
Peptona	0	-4,3250	0,7899	0	-15,3250	0,1702
EM	10 g L^{-1}	-4,8500	0,7653	10 g L^{-1}	10,3250	0,3342
NH_4Cl	0	-22,6250	0,1954	0	-27,4500	0,0315[a]

K_2HPO_4	0	5,6750	0,7273	0,8 g L^{-1}	-1,1750	0,9088
pH	8	4,5750	0,7782	8	-1,6250	0,8742
Salinidade	100%	52,3250	0,0150[a]	100%	32,1500	0,0170[a]

IF: Inóculo fúngico; IB: Inóculo bacteriano; IL: Inóculo de levedura; EL: Extrato de Levedura; EM: Extrato de Malte; E4: Ensaio 4; E13: Ensaio 13; [a] indica as variáveis de efeito significativo a $p<0,1$.

A partir da análise dos dados da Tabela 14, nota-se que para ambos os poluentes há um efeito positivo significativo para a salinidade, mostrando que este pode ser um fator importante na capacidade de detoxificação e degradação de poluentes por estes micro-organismos de origem marinha. A concentração de poluente mostrou um efeito negativo esperado. No entanto, é interessante manter a correlação entre altos níveis de detoxificação e concentração dos poluentes. O teste estatístico considera todos os ensaios realizados e para algumas variáveis, como a quantidade de inóculo, apesar de apresentarem efeito negativo, não se considerou a possibilidade de eliminação desses agentes detoxificadores, justificando a fixação dessas variáveis nos valores do melhor ensaio para cada poluente.

De acordo com a análise de correlação entre o efeito estatístico obtido para as variáveis e os valores dos melhores ensaios do planejamento PB16, as seguintes variáveis foram eliminadas para prosseguir nos testes com diesel: glicose, extrato de levedura, peptona, NH_4Cl e K_2HPO_4. As variáveis que tiveram seus valores fixados foram: inóculo de fungo filamentoso (4 cilindros), inóculo de bactéria (3 mL), inóculo de levedura (3 mL), concentração do diesel (2%) e salinidade (100%). No caso das quatro primeiras variáveis, foram considerados os valores obtidos no ensaio que apresentou a melhor condição de detoxificação (ensaio 4). Desta forma, as variáveis extrato de malte e pH tiveram seus valores alterados no planejamento subsequente Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Para os ensaios de planejamento com petróleo foram eliminados o NH_4Cl e a peptona e fixados os valores das variáveis: inóculo de fungo filamentoso (2 cilindros), inóculo de bactéria (3 mL), inóculo de levedura (1 mL), concentração do petróleo (1%), extrato de levedura (5 g/L), K_2HPO_4 (0,8 g/L), pH (8,0) e salinidade (100%). A glicose e o extrato de malte foram as duas variáveis escolhidas para prosseguir no planejamento do tipo DCCR, devido ao fato de estarem presentes no ensaio 13 e apresentarem um efeito estatístico mais alto que outras variáveis, apesar de não ser significativo.

5.5.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com o objetivo de avaliar a influência de duas variáveis sobre a detoxificação do petróleo e óleo diesel pelo consórcio selecionado, foi realizado um DCCR para cada poluente, buscando obter um modelo preditivo de resposta das condições ótimas do processo. Conforme a metodologia descrita na seção 3.8, os valores das variáveis foram determinados e estão descritos na Tabela 15. A matriz codificada dos 11 ensaios realizados para o DCCR estão apresentados no ANEXO C (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Tabela 15 – Valores codificados e reais das variáveis utilizadas para o DCCR nos ensaios com petróleo e óleo diesel.

Variáveis	**-1,41**	**-1**	**0**	**+1**	**+1,41**
			Petróleo		
Glicose (g L^{-1})	2,95	5	10	15	17,05
EM (g L^{-1})	2,95	5	10	15	17,05
			Óleo diesel		
EM (g L^{-1})	2,95	5	10	15	17,05
pH	5,59	6	7	8	8,41

EM = Extrato de malte.

Os resultados de toxicidade com *Artemia* sp. apresentados na tabela 16 mostraram baixos valores de sobreviventes, sendo que para os ensaios com o diesel nenhum teste se aproximou do resultado obtido para o planejamento do tipo PB (83,3%). Já para o petróleo, apesar do ensaio 8 se destacar com 72,2% de náuplios vivos, o valor ainda fica abaixo do obtido no planejamento anterior (76,6%), o que não era esperado neste experimento final de otimização do processo de detoxificação.

Tabela 16 – Porcentagem de larvas de *Artemia* sp. que permaneceram vivas após 24h de exposição aos ensaios de DCCR contendo diesel e petróleo.

Ensaio	**% sobreviventes – diesel**	**% sobreviventes – petróleo**
1	25,5	60
2	30	27,7
3	8,8	42,2
4	3,3	33,3
5	2,2	62,2
6	23,3	26,6
7	4,4	38,3
8	4,4	72,2
9	16,6	53,3
10	22,2	55,5

11	26,6	73,3

As análises estatísticas mostraram a influência das variáveis na detoxificação do diesel (tabela 17) e do petróleo (tabela 19) para o DCCR. Foram consideradas significativas as variáveis com $p<0,1$. Assim, de acordo com os dados apresentados na tabela 17, apenas o termo quadrático do pH foi estatisticamente significativo para os ensaios com óleo diesel.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão do DCCR 2^2 para a detoxificação do óleo diesel pelo consórcio 6.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor
Média	24,13747	5,035446	4,79351	0,003021
Extrato de malte (L)	3,60010	3,565938	1,00958	0,351663
Extrato de malte (Q)	-3,59945	3,997536	-0,90042	0,402590
pH (L)	-5,42740	3,565938	-1,52201	0,178830
pH (Q)	-7,79190	3,997536	-1,94917	0,099172
Interação EM x pH	-2,51250	5,035491	-0,49896	0,635571

Um modelo estatístico foi gerado baseado somente no coeficiente de regressão da variável significativa e, posteriormente, foi realizado um teste ANOVA (Tabela 18) para avaliar a significância estatística dessa análise. Os resultados obtidos permitem concluir que o modelo que descreve a resposta predita em função da variável estatisticamente significativa não foi adequado, visto que a porcentagem de variação explicada foi baixa (23,9%) e o valor do teste F (3,141527) não foi significativo (F calculado menor que F tabelado (3,29)), não satisfazendo os requisitos para a construção de uma superfície de resposta (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Tabela 18 – ANOVA do DCCR 2^2 para a detoxificação do óleo diesel pelo consórcio 6.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados – SQ	Graus de liberdade – GL	Quadrado médio - QM	F calculado – F_{cal}
Regressão	331,229	1	331,2295	3,141527
Resíduo	1054,358	10	105,4358	
F ajuste	939,792	7	134,256	3,515596
Erro puro	114,566	3	38,18869	
Total	1385,587	11	125,9625	

R^2 = 23,9% ; F_{tab} = 3,29

Os resultados dos coeficientes de regressão para os ensaios com petróleo estão descritos na tabela 19. Foram obtidos valores estatisticamente significativos para o termo linear e quadrático do extrato de malte, dos quais foi obtido um modelo matemático preditivo de resposta e posteriormente realizado um teste ANOVA para avaliação estatística do modelo (Tabela 20).

Tabela 19 - Coeficientes de regressão do DCCR 2^2 para a detoxificação do petróleo pelo consórcio 6.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor
Média	66,9341	7,426365	9,01303	0,000104
Extrato de malte (L)	-11,4417	5,259108	-2,17560	0,072500
Extrato de malte (Q)	-13,5646	5,895636	-2,30079	0,061034
Glicose (L)	4,4551	5,259108	0,84712	0,429415
Glicose (Q)	-8,1097	5,895636	-1,37554	0,218109
Interação EM x glicose	5,8275	7,426431	0,78470	0,462479

De forma análoga aos resultados obtidos para os ensaio com óleo diesel, os dados apresentados na tabela 20 mostram que o modelo de predição da resposta não foi adequado, já que a porcentagem de variação explicada também foi baixa (49,43%), apesar do F calculado ter sido um pouco superior que F tabelado, não satisfazendo os requisitos para a construção de uma superfície de resposta (RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Tabela 20 – ANOVA do DCCR 2^2 para a detoxificação do petróleo pelo consórcio 6.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados – SQ	Graus de liberdade – GL	Quadrado médio - QM	F calculado – Fcal
Regressão	1989,714	2	994,8572	4,399407
Resíduo	2035,210	9	226,1344	
F ajuste	1334,185	6	222,3642	0,951596
Erro puro	701,025	3	233,6749	
Total	4024,924	11	365,9022	

R^2 = 49,43% ; F_{tab} = 3,01

Dessa forma, os modelos estatísticos gerados para ambos os poluentes não explicam de uma maneira confiável os resultados dentro das condições otimizadas determinadas neste DCCR, sendo provavelmente necessária a realização de outro planejamento alterando-se a faixa de estudo de cada variável ou ainda envolvendo mais processos de triagem de variáveis anteriormente à realização do DCCR. No entanto, devido aos bons resultado obtidos no

planejamento do tipo PB e a falta de tempo hábil para realização de outros processos longos, optou-se por validar os ensaios que consideramos como os melhores resultados do PB.

5.5.4 Validação experimental

O ensaio 4 do planejamento PB com óleo diesel e o ensaio 13 com petróleo foram considerados os melhores resultados obtidos nos testes de toxicidade com *Artemia* sp. e, portanto, foram validados experimentalmente. Os ensaios foram repetidos em triplicata sob as mesmas condições do planejamento do tipo PB, analisados em 7, 14 e 21 dias de incubação.. Além disso, foi realizado um ensaio controle do consórcio sem poluente para cada período de incubação. Os ensaios foram avaliados com base nos testes de toxicidade com *Artemia* sp. e Microtox, e valores de biomassa seca foram obtidos para todos os ensaios. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados dos ensaios de toxicidade com Microtox e *Artemia* sp. para os ensaios 4 e 13 do PB após 7, 14 e 21 dias de incubação com diesel e petróleo, respectivamente.

	7 dias		**14 dias**		**21 dias**	
Amostra	**Microtox** EC_{50}(%) – 30 min	**Artemia** % vivos	**Microtox** EC_{50}(%) – 30 min	**Artemia** % vivos	**Microtox** EC_{50}(%) – 30 min	**Artemia** % vivos
Cont. ensaio 4	29,67	80	83,28	94,4	-*	100
Réplica 1 – diesel	5,94	45,5	3,08	50	15,63	93,3
Réplica 2 – diesel	13,60	82,2	14,36	71,1	15,91	86,6
Réplica 3 – diesel	4,97	33,3	19,64	85,5	20,23	63,3
Média ± DP	8,17 ± 4,72	53,6 ± 25,4	12,36 ± 8,45	68,8 ± 17,8	17,25 ± 2,57	81,06 ± 15,7
Cont. ensaio 13	38,62	90	62,88	97,7	91,15	98,8
Réplica 1 – pet.	35,08	92,2	24,85	73,3	10,98	87,7
Réplica 2 – pet.	23,75	61,1	16,89	31,1	23,04	95,5
Réplica 3 – pet.	22,78	65,5	13,36	2,2	21,15	94,4
Média ± DP	27,2 ± 6,83	72,9 ± 16,8	18,36 ± 5,8	35,5 ± 35,7	18,39 ± 6,48	92,5 ± 4,2

Cont. ensaio 4 = Controle do ensaio 4 do planejamento PB sem óleo diesel; Cont. ensaio 13 = Controle do ensaio 13 do planejamento PB sem petróleo;
DP = Desvio padrão;
* O programa do equipamento Microtox 500 não pôde calcular o EC_{50}.

Com base nos dados apresentados na Tabela 21, podemos notar que os ensaios controle conferem coerência aos testes, já que observamos alta porcentagem de sobreviventes de *Artemia* sp. e valores de luminescência de *V. fischeri* mais altos para os ensaios na ausência dos poluentes. Além disso, quando analisado em Microtox, o ensaio controle com diesel incubado por 21 dias obteve valores de luminescência maiores que o controle do teste, onde não há contato da bactéria com a amostra. Dessa forma, o efeito de redução da luminescência foi negativo e, portanto, a amostra não se mostrou tóxica e o programa do equipamento Microtox 500 não pôde calcular um coeficiente de regressão e o EC_{50} neste caso. Para fins de comparação, foi analisado em Microtox uma amostra com o meio utilizado no ensaio 4 do planejamento PB e 2% de óleo diesel, do qual foi obtido um EC_{50} no valor de 0,1895%, mostrando ser uma amostra tóxica e reafirmando a coerência da atividade de *V. fischeri* nos ensaios com Microtox.

Observa-se um aumento crescente de ambos os valores da média das triplicatas de EC_{50} e de sobreviventes de náuplios de *Artemia* sp. conforme o aumento do período de incubação do ensaio 4 com o diesel, demonstrando a necessidade de contato dos micro-organismos com o poluente por um período mais longo para realização da detoxificação. Ameen et al. (2015) demonstraram a capacidade de cinco fungos isolados de mangue em degradar os principais hidrocarbonetos presentes no óleo diesel após 30 dias de incubação, evidenciando a necessidade de um período mais longo para que se torne possível a utilização das frações mais pesadas do diesel nos processos metabólicos de alguns micro-organismos.

Em relação aos dados obtidos para o ensaio 13 incubado com petróleo, é possível observar que o melhor resultado de toxicidade utilizando Microtox 500 foi na incubação a 7 dias, enquanto que para os testes com *Artemia* sp. foi a 21 dias. Apesar desta diferença entre os melhores resultados de detoxificação e o período de incubação, é importante notar que o processo de otimização permitiu atingir um nível de detoxificação do petróleo em 7 dias bastante semelhante ao obtido em 21 dias, principalmente se considerarmos que a porcentagem de sobreviventes de *Artemia* sp. no primeiro planejamento do tipo PB para este ensaio (76,6%) é bastante semelhante ao obtido na média das triplicadas de validação em 7 dias (72,9%), sendo esta diferença percentual responsável por apenas cerca 3 ou 4 larvas de *Artemia* sp. Por outro lado, nota-se também que nestes ensaios de validação a média de triplicata em 21 dias (92,5%) foi cerca de 20,75% maior que o mesmo ensaio no primeiro planejamento do tipo PB, validando a otimização e reiterando a capacidade do consórcio selecionado em detoxificar o petróleo sob as condições analisadas.

Além disso, para o ensaio 13 com petróleo, houve uma queda na média de detoxificação para ambos os testes de toxicidade de 7 para 14 dias. Tal fato pode ter ocorrido devido à liberação de produtos de degradação mais tóxicos no período intermediário de incubação do consórcio. Adicionalmente, houve uma notável variação nos valores obtidos nas réplicas do ensaio com petróleo em 14 dias, gerando um alto desvio padrão. Estas diferenças observadas entre as réplicas podem ser decorrentes de diversos fatores que envolvem testes com organismos biológicos e afetam os resultados, como a origem do inóculo microbiano, variação na forma de exposição dos testes à luz, geração de diferentes produtos metabólicos, possível contaminação do consórcio, dentre outros inúmeros fatores (JACOB et al., 1980; NUNES et al., 2006).

A realização de testes de toxicidade com mais de um organismo é fundamental para que seja considerada a diferença de sensibilidade frente ao poluente entre espécies diferentes, de forma que não podemos extrapolar o efeito de uma substância em uma espécie para outras (COSTA et al., 2008). Dessa forma, de acordo com os dados apresentados na Tabela 21, podemos notar maior sensibilidade da bactéria *V. fischeri* frente às amostras testadas, já que mostrou valores de EC_{50} mais baixos quando comparados às porcentagens de larvas de *Artemia* sp. vivas nos mesmos ensaios.

Os resultados obtidos a partir da validação do delineamento experimental do tipo PB mostraram que a otimização possibilitou dobrar a concentração do diesel (2%) e obter uma porcentagem de náuplios de *Artemia* sp. vivos (81,06%) 76,21% maior que o número de larvas sobreviventes no processo anterior à otimização (46%) incubado pelo mesmo período de tempo (21 dias). Além disso, os resultados obtidos com Microtox nos ensaios com diesel em 21 dias corroboram os dados, mostrando um aumento de 7,8% no valor do EC_{50} após o planejamento experimental. De forma semelhante, o resultado do teste com *Artemia* sp. para o ensaio com petróleo após a otimização quando incubado por 21 dias (92,5%) apresentou 54,16% a mais de larvas sobreviventes em relação ao processo anterior (60%). No entanto, quando incubado por 7 dias, houve um aumento de 21,5% de náuplios de *Artemia* sp. vivos em relação ao processo anterior à otimização (incubado por 21 dias), mostrando a possibilidade de redução do tempo de ensaio para o processo de degradação/detoxificação do petróleo. Ademais, o resultado obtido com Microtox em 7 dias se mostrou promissor e 47,9% maior (27,2%) do que o valor obtido da média dos ensaios após 21 dias de incubação (18,39%).

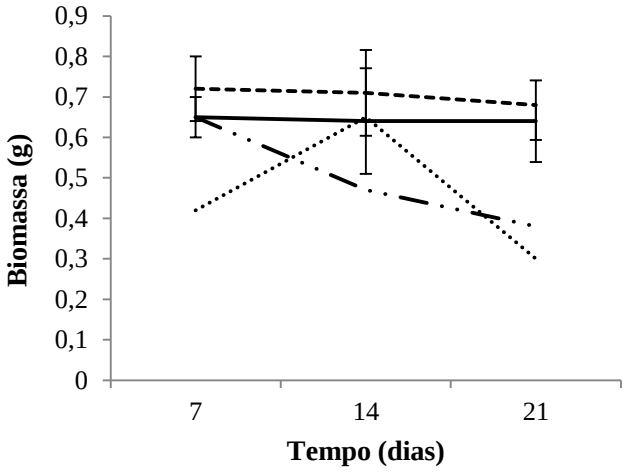
O planejamento experimental realizado permitiu avaliar algumas variáveis dentre inúmeros fatores que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo. O efeito positivo da salinidade na capacidade do consórcio 6 (A. *sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus* sp. CBMAI 707 e *C. laurentii* CRM 707) atuar na detoxificação do petróleo e óleo diesel, reforçam o potencial de aplicação desse consórcio microbiano na biorremediação, uma vez que o processo de produção, transporte e refino do petróleo geram efluentes residuais com amplo gradiente de salinidade, o que pode limitar a eficácia de procedimentos convencionais de biorremediação e reiterar a importância da atuação de micro-organismos adaptados à salinidade no processo de degradação desses poluentes (DIAZ et al., 2000). Além disso, a incubação com ambos os poluentes mostraram melhores resultados em pH 8,0, demonstrando maior afinidade com meio levemente alcalino, porém ainda se mantendo dentro da faixa de pH normalmente descrita para que ocorra a biodegradação do petróleo (DAS & CHANDRAN, 2010).

O ensaio 4 incubado com óleo diesel contem apenas o extrato de malte como fonte de carbono, o que o torna vantajoso em relação ao custo mais baixo para o desenvolvimento do processo. Magrini (2012) mostrou em estudo anterior do grupo, que o fungo marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 também obteve os melhores resultados com degradação de HPAs quando incubado com meio de cultura contendo extrato de malte. Já o ensaio 13 incubado com 1% de petróleo continha além do extrato de malte, glicose e extrato de levedura como fonte de carbono adicional ao processo. O extrato de levedura já foi reportado como uma excelente fonte de nitrogênio, principalmente para o crescimento bacteriano, pois contém diversos íons metais e micronutrientes requeridos no processo de biodegradação (HUANG et al., 2008). Além disso, a taxa de degradação de petróleo pode ser limitada pela falta de disponibilidade de fósforo no meio, justificando a presença e utilização do K_2HPO_4 pelo consórcio microbiano (HUANG et al., 2008; ZAHED et al., 2010; MOHAJERI et al., 2010).

Os resultados de biomassa dos consórcios estão apresentados na Figura 13. Podemos observar que os valores foram semelhantes em 7, 14 e 21 de incubação para ambos petróleo e óleo diesel, mostrando que a possível utilização dos hidrocarbonetos como fonte de carbono adicional não acarretou em aumento da biomassa ao longo do tempo. No entanto, nota-se que os valores de biomassa foram menores nos testes controle (sem poluente), com exceção do ensaio com diesel incubado a 14 dias, onde o valor foi igual à média da triplicata dos ensaios com o poluente. Dessa forma, apesar da pequena diferença de biomassa ao longo do tempo de incubação, os valores mais baixos apresentados nos ensaios controle confirmam a

possibilidade de utilização dos poluentes como fonte de carbono adicional pelos micro-organismos do consórcio.

Figura 13 - Biomassa dos ensaios de validação do planejamento PB após 7, 14 e 21 dias de incubação.



Diesel; Controle diesel; Petróleo; Controle petróleo. Os valores dos ensaios com os poluentes são médias das triplicatas.

5.5.5 Avaliação da atividade enzimática dos ensaios otimizados

5.5.5.1 Atividade de lacase, MnP e LiP

A avaliação da atividade das três enzimas do sistema ligninolítico (lacase, MnP e LiP) foi realizada para todos os ensaios de validação do planejamento experimental. No entanto, não foi detectada atividade para nenhuma dessas enzimas, mostrando que os fungos presentes no consórcio provavelmente utilizaram outra via metabólica para degradação de estruturas presentes no petróleo e óleo diesel, como a P450 monoxigenase, que é uma enzima intracelular e já foi reportada no metabolismo de fungos capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SYED et. al, 2010; KARIGAR & RAO, 2011). Yadav & Reddy (1993) analisaram a degradação de BTEX pelo fungo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* e verificaram que o fungo foi capaz de degradar esses compostos, porém quando a produção de LiP e MnP foi suprimida, mostrando que estas peroxidases extracelulares não estavam envolvidas na degradação desses compostos. Estudos anteriores do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette indicam a utilização da via metabólica P450 monoxigenase e epóxido hidrolases na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos tanto por fungos basidiomicetos (MAGRINI, 2012) quanto por ascomicetos (VASCONCELOS, 2015). No estudo realizado por Vasconcelos (2015), o fungo

Chaunopycnis alba CBMAI 1346 quando cultivado na condição otimizada de degradação de pireno (ensaio de validação) apresentou expressiva produção de MnP e os metabólitos formados durante o processo degradativo foram identificados como sendo de cadeia aberta (ceteno, hexadecano, octadeceno, 5-eicoseno, eicosano e álcool behênico), sugerindo a biotransformação da molécula de pireno por este fungo. Em adição, após o cultivo do fungo nas condições otimizadas para degradação de pireno, experimentos de transcriptômica indicaram a produção de três principais classes de enzimas: Oxidorredutases (EC1), Transferases (EC2) e Hidrolases (EC3) (dados não publicados).

Os resultados obtidos nos ensaios de validação reiteram aqueles obtidos anteriormente no processo de triagem dos consórcios, onde não foi observada atividade de lacase e MnP pelo consórcio 6.

5.5.5.2 Atividade de lipase

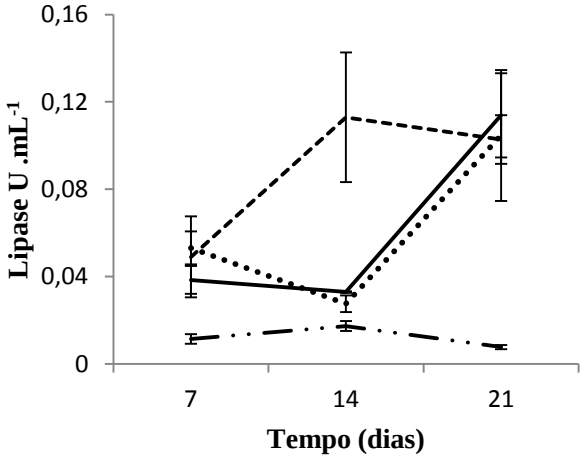
Foi observada atividade de lipase pelos ensaios de validação com óleo diesel e os resultados estão apresentados na Figura 14. A maior atividade foi de 0,1139 $U.mL^{-1}$, para a amostra da réplica 1 em 21 dias, a qual também apresentou o maior valor de detoxificação *Artemia* sp. (Tabela 21). Além disso, nota-se que os valores de atividade enzimática para o ensaio controle sem o diesel são mais baixos do que os valores obtidos na presença do poluente, apresentando o máximo de atividade de 0,0174 $U.mL^{-1}$ em 14 dias de incubação. Tais dados permitem correlacionar a atividade lipolítica com o aumento da degradação/detoxificação do óleo diesel, conforme já reportado em outros trabalhos (MARGESIN et al., 2007; KATO et al., 2001). Sabe-se que os produtos liberados na quebra de hidrocarbonetos induzem a atividade enzimática e podem servir de substrato para hidrolases, mas a atuação desta enzima na estrutura desses compostos ainda não é descrita com clareza na literatura (MARGESIN et al., 2007; KARIGAR & RAO, 2011).

Os resultados obtidos nas réplicas 1 e 2 foram semelhantes, com atividade de lipase menor em 7 e 14 dias e aumento em 21 dias, enquanto a réplica 3 apresentou um aumento de atividade de 7 para 14 dias e manteve um valor próximo em 21 dias. Quando comparamos esses dados com os valores de toxicidade apresentados na Tabela 21, notamos que há semelhança nos resultados, já que a réplica 3 com óleo diesel apresentou aumento dos valores em microtox e *Artemia* sp. em 14 dias de incubação e queda da porcentagem de sobreviventes de *Artemia* sp. em 21 dias, porém com um pequeno aumento em relação ao valor de microtox.

Estes dados sugerem a existência de uma correlação entre a capacidade de detoxificação do diesel pelo consórcio e a atividade lipolítica presente na amostra.

Em estudo anterior do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette, responsável pelo isolamento e seleção da levedura lipolítica da Antártica *C. laurentii* CRM 707, a lipase produzida foi quantificada inicialmente em 0,143 $U.mL^{-1}$ quando cultivada em meio líquido a 20°C e 180 rpm e azeite de oliva como indutor (DUARTE, 2014). O valor máximo de atividade obtido para os ensaios com óleo diesel (0,1139 $U.mL^{-1}$) a 28°C é aproximadamente 1,25 vezes menor que o apresentado nas condições de temperatura e meio de cultivo em que a levedura é melhor adaptada, mostrando que os produtos possivelmente liberados pela degradação do óleo diesel podem ser indutores desta enzima.

Figura 14 - Atividade da lipase (U/mL) dos ensaios de validação do planejamento PB com óleo diesel após 7, 14 e 21 dias de incubação.

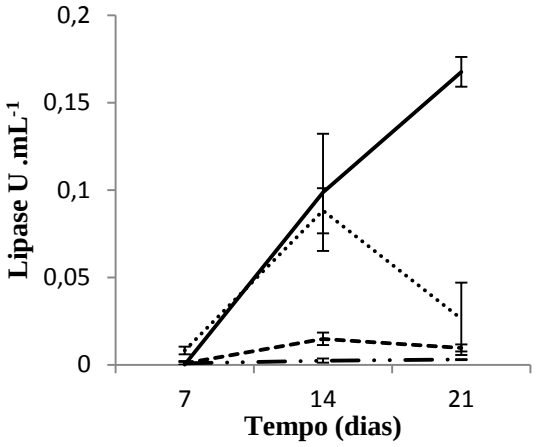


Réplica 1; Réplica 2; Réplica 3; Controle diesel. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o desvio padrão.

A atividade de lipase também foi observada para os ensaios com petróleo e os resultados para cada réplica e controle estão apresentados na Figura 15. A réplica 1 foi a que apresentou maior atividade de lipase, com 0,167 $U.mL^{-1}$ após 21 dias de cultivo. Este resultado se mostrou superior àquele obtido no processo de seleção da *C. laurentii* CRM 707 (0,143 $U.mL^{-1}$), descrito por Duarte (2014). Todas as réplicas mostraram baixa atividade em 7 dias, variando entre 0,00018 $U.mL^{-1}$ (réplica 1) e 0,0081 $U.mL^{-1}$ (réplica 2). Além disso, houve aumento da produção enzimática em 14 dias nas três réplicas, com posterior queda em

21 dias nas réplicas 2 e 3. Dessa forma, apesar de existir atividade enzimática nos ensaios com petróleo, nota-se que não é possível correlacionar esses resultados com os dados de toxicidade (Tabela 21). No entanto, observa-se que na ausência de petróleo a atividade enzimática foi quase nula, variando de 0,00084 $U.mL^{-1}$ a 0,0029 $U.mL^{-1}$ entre as tréplicas, indicando possível indução da atividade enzimática pelo poluente.

Figura 15 - Atividade da lipase (U/mL) dos ensaios de validação do planejamento PB com petróleo após 7, 14 e 21 dias de incubação.



Réplica 1; Réplica 2; Réplica 3; Controle petróleo. Os valores são médias de triplicatas e as barras verticais demonstram o desvio padrão.

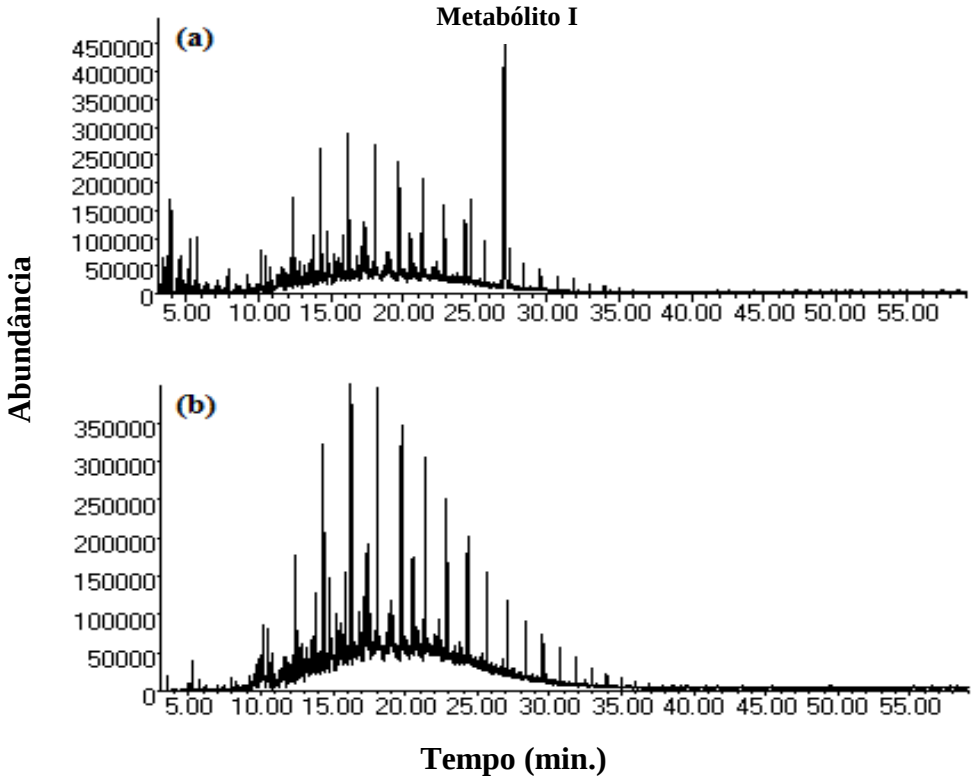
A diferença estrutural entre o petróleo e diesel pode acarretar a liberação de diferentes produtos decorrentes da degradação, o que pode ser responsável por essa variação no padrão de indução da atividade de lipase entre os dois poluentes estudados. No entanto, os resultados obtidos para esta enzima estão de acordo com estudos de monitoramento de descontaminação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, mostrando que a avaliação da atividade de lipase pode ser um indicador de degradação desses compostos (MARGESIN et al., 2007; KARIGAR & RAO, 2011; RIFFALDI et al., 2005; KATO et al., 2001).

5.6 Análise dos componentes presentes no petróleo bruto e óleo diesel por CG/EM

Os perfis cromatográficos do óleo diesel recuperado das amostras do consórcio 6 incubado a 7, 14 e 21 dias foram bastante semelhantes (APÊNDICE 1) e a Figura 16 apresenta uma análise comparativa entre os cromatogramas do diesel incubado a 7 dias e do diesel puro, anterior ao tratamento (controle). Os resultados apresentados possibilitam inferir que houve redução das frações iniciais do diesel após 7 dias de incubação, além da redução de alguns picos. O metabólito I, destacado na Figura 16 (a), possui íon molecular (M^+) de m\z

294 e foi identificado como ácido octadecadienoico, metil éster. Este composto é um éster metílico de ácido graxo e sua presença na composição do poluente estudado pode estar relacionada à norma estabelecida pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) na lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, onde se torna obrigatório que todo óleo diesel automotivo vendido no Brasil seja misturado com 7% de biodiesel (SRIVASTAVA & PRASAD, 2000; BRASIL, 2014). O biodiesel é produzido a partir de óleo vegetais ou gorduras animais e, portanto, a metabolização desse composto pelo consórcio estudado pode estar relacionado com a atividade lipolítica apresentada, uma vez que esta enzima atua em óleos biológicos e podem catalisar a clivagem e formação das ligações éster em substratos solúveis em água (FERNANDES, 2002).

Figura 16 - Perfil cromatográfico do diesel anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 após 7 dias de incubação (b).



A Figura 17 mostra os primeiros 6 minutos de eluição das amostras controle e do diesel incubado a 7 dias com o consórcio 6. Sob as condições experimentais deste trabalho, quatro metabólitos tiveram identificações sugeridas pelo programa e estão destacados na Figura 17 e descritos na Tabela 22. O tolueno e o xileno são compostos conhecidamente tóxicos e, apesar de menos abundantes, estiveram presentes no perfil cromatográfico dos

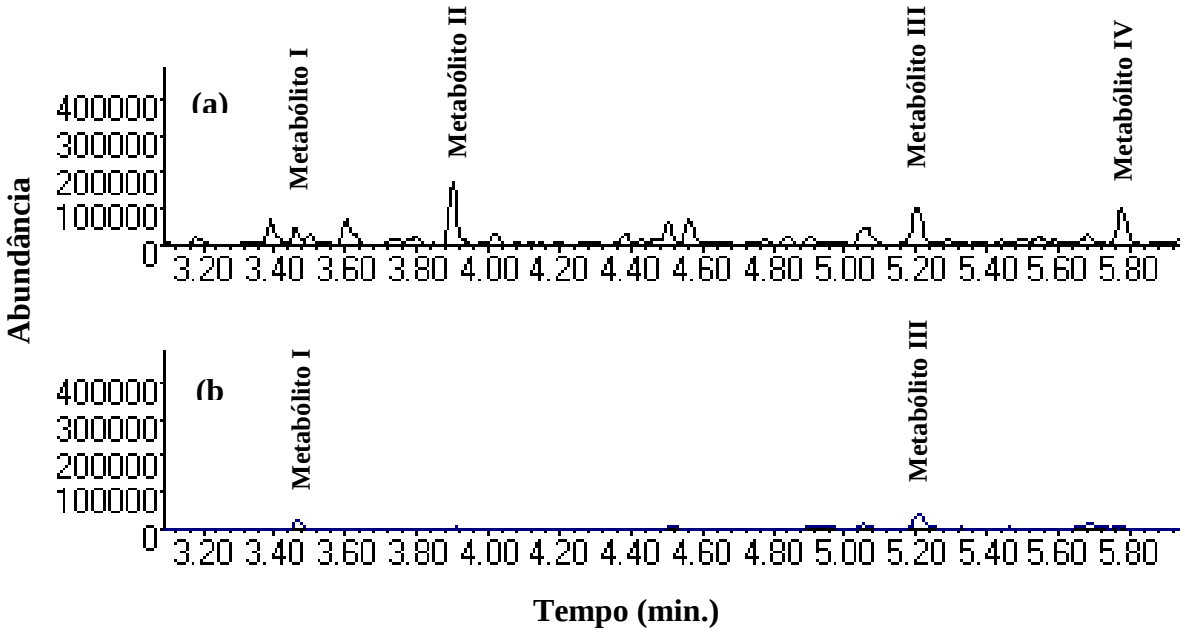
ensaios incubados a 7, 14 e 21 dias. No entanto, deve-se considerar que a menor abundância desses compostos pode ser devido não apenas à possível degradação pelos micro-organismos do consórcio, mas também por prováveis perdas do composto durante o processo de extração do diesel da amostra. Conforme já reportado em estudos anteriores, a degradação do tolueno por fungos se dá incialmente por um ataque oxidativo no grupo metil, o que se assemelha à rota de degradação bacteriana para metabolização do tolueno e do xileno (WEBER et al., 1995; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002; FUENTES et al., 2014). Normalmente, esta etapa inicial de degradação é realizada por enzimas oxigenases, que são caracterizadas como intracelulares.

Podemos ainda observar na Figura 17 que os picos correspondentes ao octano e nonano não aparecem no perfil cromatográfico do diesel incubado por 7 dias com o consórcio estudado. Dessa forma, podemos inferir que houve degradação desses compostos pelos micro-organismos constituintes do consórcio. A via metabólica de degradação de alcanos para a maioria dos micro-organismos envolve uma etapa inicial de oxigenação do composto por uma monoxigenase ou pelo citocromo P450 monoxigenase (FUENTES et al., 2014; HADIBARATA & TACHIBANA, 2009).

Tabela 22 - Identificação dos metabólitos presentes nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM.

Metabólito	**t_R (min)**	**Íon molecular**	**Composto sugerido**
I	3,462	92	Tolueno
II	3,901	114	Octano
III	5,206	106	O-xileno
IV	5,778	128	Nonano

Figura 17 - Perfil cromatográfico do diesel anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 por 7 dias (b), nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM.



Devido às características do petróleo, houve maior dificuldade na realização da extração deste composto das amostras e não foi possível obter perfis cromatográficos com resolução satisfatória para as amostras de 14 e 21 dias de incubação. No entanto, foi obtido o cromatograma do petróleo incubado a 7 dias, o qual está apresentado na Figura 18, em comparação com a amostra controle do petróleo (sem incubação com o consórcio). De forma semelhante ao diesel, o resultado obtido a 7 dias mostra uma redução das frações iniciais do petróleo. Além disso, observa-se diversos picos com a abundância reduzida em comparação ao controle, o que não nos permite afirmar que se deu pela degradação dos compostos pelos micro-organismos ou por uma baixa concentração de amostra devido às dificuldades encontradas na metodologia de extração do poluente.

No entanto, quando aumentamos a visualização do gráfico nos primeiros minutos de análise (Figura 19) nota-se que os compostos identificados são semelhantes àqueles encontrados no perfil cromatográfico do diesel, onde se mantiveram presentes os picos correspondentes ao tolueno e o-xileno, enquanto octano e nonano não aparecem no cromatograma do petróleo após incubação com o consórcio por 7 dias. Os alcanos com cadeia acima de 9 carbonos foram identificados pelo programa, mas não foram degradados pelo consórcio.

Figura 18 - Perfil cromatográfico do petróleo anterior ao tratamento (a) e após tratamento com o consórcio 6 por 7 dias (b).

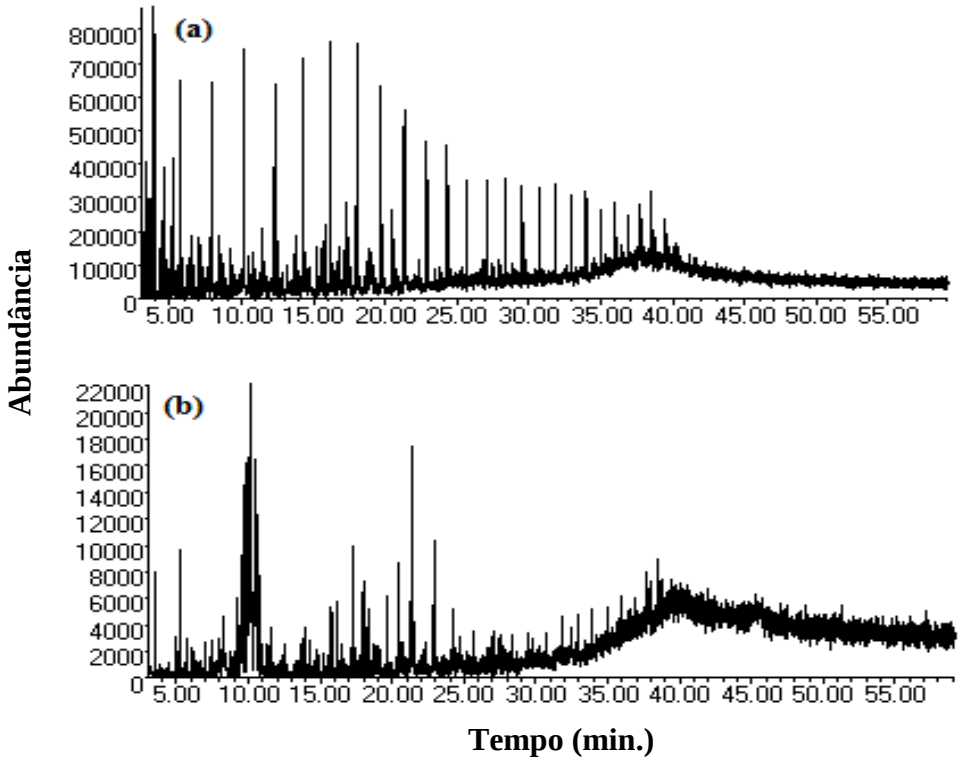
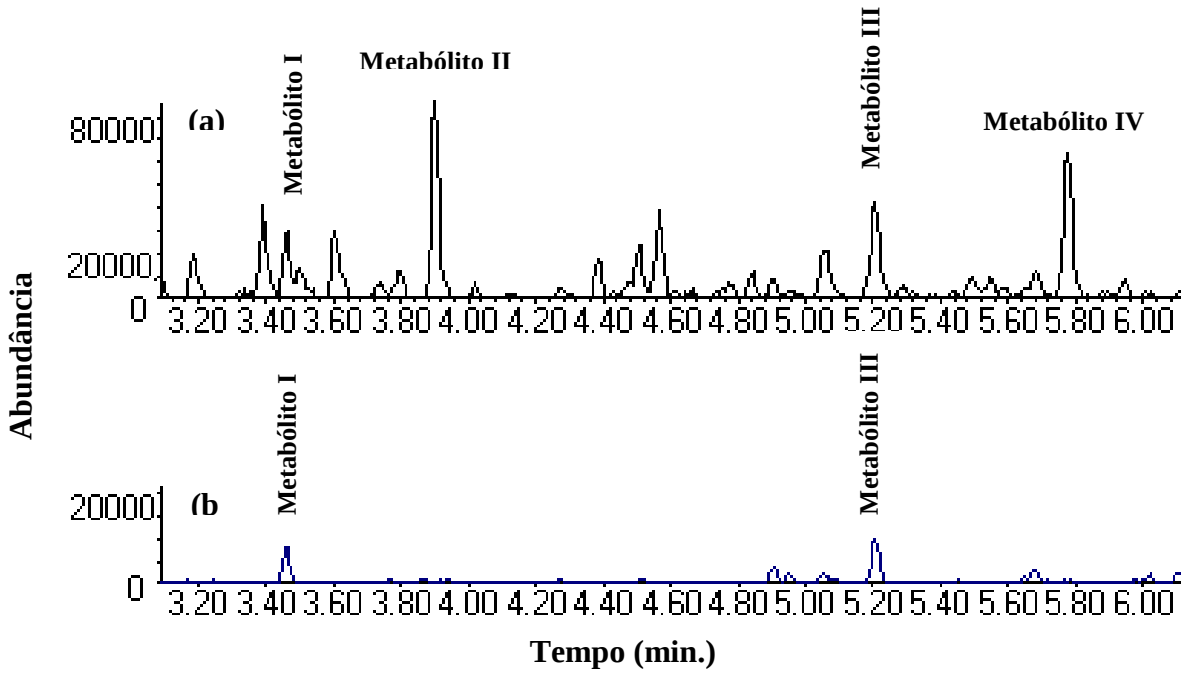


Figura 19 - Perfil cromatográfico do petróleo anterior ao tratamento (a) e após o tratamento com o consórcio 6 por 7 dias (b), nos primeiros 6 minutos de análise em CG/EM



Os compostos não mencionados e que estão presentes nos cromatogramas das amostras controle de ambos diesel e petróleo, mas não aparecem nas amostras incubadas a 7 dias não puderam ser identificados pela base de dados NIST. No entanto, as condições metodólogicas utilizadas para análise dos constituintes das amostras permitem concluir que houveram mudanças na constituição e perfil cromatográfico do petróleo e do óleo diesel após a incubação com os micro-organismos constituintes do consórcio 6, sugerindo atuação na degradação e detoxificação desses compostos.

6. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer dez consórcios microbianos constituídos por micro-organismos de origem marinha com potenciais conhecidos para atuar na biorremediação e avaliá-los em relação à detoxificação de petróleo e óleo diesel. O teste utilizando o indicador DCPIP não se mostrou como uma metodologia satisfatória, pois não foram obtidos resultados coerentes para os ensaios controle com fungos filamentosos. No entanto, os resultados de biomassa indicaram possível utilização do petróleo e óleo diesel como fonte de carbono adicional ao crescimento pelos micro-organismos.

Os consórcios 3 e 8 mostraram maior produção de lacase, o que pode se relacionar com a presença do fungo *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062, já conhecido como bom produtor desta enzima. Além disso, o petróleo foi um substrato mais indutor para a produção de lacase quando comparado ao diesel, mostrando que a diferença estrutural desses hidrocarbonetos pode influenciar a produção dessas moléculas biológicas.

Os testes de toxicidade utilizados permitiram realizar a triagem dos consórcios, pois os resultados com *Artemia* sp. corroboraram aqueles obtidos frente à bactéria *V. fischeri* e o consórcio 6 composto pelos micro-organismos A. *sclerotiorum* CBMAI 849, *C. cladosporioides* CBMAI 857, *Bacillus* sp. CBMAI 707 e *C. laurentii* CRM 707 foi selecionado para prosseguir nas etapas seguintes do trabalho devido ao maior potencial para detoxificação do petróleo e óleo diesel.

O planejamento experimental e sua análise estatística mostraram ser uma ferramenta importante para avaliação da detoxificação do petróleo e óleo diesel, pois permitiu estabelecer condições mais adequadas para a atuação dos micro-organismos. Além disso, o delineamento experimental possibilitou aumentar a detoxificação dos poluentes pelo consórcio selecionado, além de elevar a concentração do óleo diesel (2%) quando incubado apenas com extrato de malte como fonte de carbono adicional, permitindo assim reduzir o custo do processo. Adicionalmente, os ensaios com petróleo incubado a 7 dias apresentaram resultados promissores, mostrando a possibilidade de redução do tempo de tratamento após a otimização.

O efeito positivo estatisticamente significativo da salinidade na detoxificação do petróleo e óleo diesel, mostra o potencial de aplicação do consórcio 6 na biorremediação de ambientes salinos, além de sua possível utilização como indicador de toxicidade em resíduos dessa natureza.

As análises enzimáticas realizadas mostraram que as enzimas do sistema ligninolítico (lacase, MnP e LiP) não estão envolvidas no processo detoxificação. No entanto, foi observada atividade de lipase, sendo possível correlacionar os resultados desta enzima com os

dados de toxicidade de *Artemia* sp. e microtox nos ensaios com diesel, sugerindo a possibilidade de correlação entre a capacidade de detoxificação e a atividade lipolítica.

A análise de CG/EM mostrou mudanças no perfil cromatográfico do petróleo e do óleo diesel após tratamento com o consórcio 6, indicando que ocorreu degradação principalmente das frações mais leves desses poluentes.

Os resultados apresentados no trabalho evidenciam o potencial do consórcio 6 na remediação de ambientes e resíduos salinos contaminados com petróleo ou óleo diesel. Além disso, o presente trabalho abre novas possibilidades de estudos futuros envolvendo processos de escalonamento da aplicação do consórcio, estudo de enzimas envolvidas no processo, bem como a avaliação dos genes que codificam as enzimas envolvidas na detoxificação por meio de estudos de metatranscriptômica.

REFERÊNCIAS

ADEKUNKLE, A.A., ADEBAMBO,O.A. Petroleum Hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium Senegalenses* (J. F. Gmelin) seeds. **Journal of American Science**, v.3, n.1, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL. **Atlas de energia elétrica do Brasil: Derivados de petróleo.** Ed. – Brasília: Aneel, 2008. Disponível em: < www.**aneel**.gov.br/arquivos/PDF/**atlas**3ed.pdf> Acesso em: 10 fev. 2016.

AMEEN, F., MOSLEM, M., HADI, S., AL-SABRI, A.E. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.

ANDRADE, J. A., AUGUSTO, F., JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, 2010.

ARAÚJO, C.S.T., HOSHINA, M.M., SILVA, M.T.P., ROBERTO, M.M., HARA, R.V., MARIN-MORALES, M.A. Oil spills: Environmental Consequences and recovery strategies. In: CLIFTON, A. **Oil Spills: Environmental issues, prevention and ecological impacts.** New York: Nova Science publishers, 2014.

ARORA, D. S., GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p. 602-605, 2001.

ATLAS, R.M., Bioremediation of petroleum pollutants. **International biodeterioration & biodegradation**, p. 317-327, 1995.

BAMFORTH, S.M., SINGLETON,I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, p. 723-736, 2005.

BOLETIM Anual de Preços 2014: preços do petróleo, gás natural e combustíveis nos mercados nacional e internacional. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Rio de Janeiro: ANP, 2014. Disponível em: < www.**anp**.gov.br/?dw=73131 >. Acesso em: 14 fev. 2016.

BONUGLI-SANTOS, R.C. **Fungos derivados de macro-organismos marinhos: diversidade genética e potencial biotecnológico**. 2010. 168 p. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BONUGLI-SANTOS, R.C., Durrant, L.R. & Sette, L.D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114, p. 863-872, 2010b.

BONUGLI-SANTOS, R.C., Durrant, L.R. & Sette, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme Microbiogy Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010ª

BONUGLI-SANTOS, R.C., VASCONCELOS, M.R.S., PASSARINI, M.R.Z., VIEIRA, G.A.L., LOPES, V.C.P., MAINARDI, P.H., SANTOS, J.A., DUARTE, L.A., OTERO, I.R.,

YOSHIDA, A.M.S., FEITOSA, V.A., PESSOA JR., A., SETTE, L.D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**. V.6, n. 269, 2015.

BONUGLI-SANTOS, R.C., VIEIRA, G.A.L., COLLINS, C., FERNANDES, T.C.C., MARIN-MORALES, M.A., MURRAY, P., SETTE., L.D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research** pp 1-10, 2016.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Thibodaux, v. 74, p. 63-67, 2000.

BRASIL, lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. **Constituição da república federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 193º da Independência e 126º da República, 24 set. 2014.

BRASIL, Resolução ANP n° 50, de 23 de dezembro de 2013. **Diário oficial da União**. Brasília, DF, 23 dez. 2013.

BRASIL, Resolução CONAMA n° 415, de 24 de setembro de 2009. **Diário oficial da União**. Brasília, DF, n. 184, 25 set. 2009, p. 53 e 54.

BRASIL, Resolução n° 46, de 20 de dezembro de 2012, Agência nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis – ANP. **Diário oficial da União**. Brasília, DF, 12 dez. 2012, Seção 1, p. 829 e 840.

BRAUN, S., APPEL, L.G., SCHMAL, M. A poluição gerada por mpaquinas de combustão interna movidas à diesel – a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, v. 27, n.3, p. 472-482, 2003.

BUGNI, T. S., IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 143-163, 2004.

BUSWELL, J. K., CAI, Y. J., CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters,** v. 128, p. 81-88, 1995.

CELIK, G.Y., ASLIM, B., BEYATLI,Y. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by Pseudomonas stutzeri strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 6, p. 867-870, 2008.

CERNIGLIA, C. E., SUTHERLAND, J. B. 2001. Bioremediation of polycyclyc aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In: GADD, G. M. (Ed). **Fungi in Bioremediation.** Britsh Mycological Society Symposium Series, Cambridge University Press, p. 136-187.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **O petróleo da história antiga aos tempos atuais**, São Paulo, 2011. Disponível em: < emergenciasquimicas.cetesb.sp.gov.br/.../O-petroleo-historia-antiga-tempos-atuias.pdf> Acesso em: 10 fev. 2016.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Principais acidentes internacionais**, São Paulo, 2011. Disponível em: < emergenciasquimicas.cetesb.sp.gov.br/wp.../Principais-acidentes-internacionais.pdf> Acesso em: 10 fev. 2016.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Teste de toxicidade com a bactéria luminescente Vibrio fischeri: método de ensaio.** Norma técnica L5.227, São Paulo, 2001, 13p.

COSTA, C. R., OLIVI, P. BOTTA, C. M. R., ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DAS, N., CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2010.

DASTGHEIB, S. M. M., AMOOZEGAR, M. A., KHAJEH, K., VENTOSA, A. A halotolerant *Alcanivorax* sp. strain with potential application in saline soil remediation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 305-312, 2011.

DEESE, R.D., LEBLANC, M.R., COOK, R.L. Surfactant toxicity to *Artemia franciscana* and the influence of humic acid and chemical composition. **Environmental chemistry**, 2015.

DIAZ, M.P., GRIGSON, S.J.W., PEPPIATT, C.J., BURGESS, J.G. Isolation ans characterization of novel hidrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. **Marine biotechnology**, v.2, p. 522-532, 2000.

DUARTE, A.W.F**. Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases.** 2014. Tese de doutorado em biotecnologia. Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.

FERNADES, M.L.M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas.** 2002. Dissertação de Mestrado, PG Química – Área de concentração em química orgânica, Curitiba, PR.

FRANCISCO, J.L., FRANÇA, K.C. Métodos de tratamento de resíduos de petróleo. **Dossiê técnico – Rede de tecnologia do Rio de Janeiro (REDETEC).** Dezembro, 2007.

FUENTES, S., MÉNDEZ, V., AGUILA, P., SEEGER, M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 98, p. 4781-4794, 2014.

GAO, H., WANG, Y., ZHANG, W., WANG, W., MU, Z. Isolation, identification and application in lignin degradation of na ascomycete GHJ-4. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 20, p. 4166-4174, 2011.

GENTRY, T.J., RENSING, C., PEPPER, I.L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical reviews in environmental Science and technology**, v. 34, p. 447-494, 2004.

GHAZALI, F.M., RAHMAN, R.N.Z.A, SALLEH, A.B., BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International biodeterioration & biodegradation**, v.54, p. 61-67, 2004.

GOMES, G.M. **Análise de dutos corroídos pelo método dos elementos finitos**. 2007. Dissertação de Mestrado, PG Engenharia civil, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ.

GUPTA, R., RATHI, P., GUPTA, N., BRADOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 37, p. 63-71, 2003.

HADIBARATA, T., TACHIBANA, S. Microbial degradation of n-Eicosane by filamentous fungi. **Insterdisciplinary studies nos envrionmental chemistry - Environmental research in Asia**, p. 323-329, 2009.

HANSON, K.G., DESAI, J.D., DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.7, n. 10, p.745-748, 1993.

HARAYAMA, S., KISHIRA, H., KASAI, Y., SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal Molecular Microbiology Biotechnology**, v.1, n.1, p. 63-70, 1999.

HARITASH, A.K., KAUSHIK,C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Harzadous Materials**. Hisar, v.169, p. 1-15, 2009.

HASAN, F., SHAH, A.A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases**.** **Enzymes and microbial technology**, v.39, p. 235-251, 2006.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C. AND YAN, B. Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, 39, 1415–1419, 2004.

HUANG, L., MA, T., LI, D., LIANG, F., LIU, R., LI, G. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by Rhodococcus erythropolis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 1714-1718, 2008.

JACOB, P.G., ZARBA, M.A., SALEM, A.A. Results of toxicity tests with marine organisms of Kuwaiti coast. **Indian Journal Fish**, v. 27, p. 111-122, 1980.

JACQUES, R. J. S., BENTO, F.M., ANTONIOLLI, Z.I., CAMARGO, F.A.O, Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n.4, p. 1192-1201, 2007.

JONES, E. B. G. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. **Fungal Diversity.** v. 4, p. 53–73, 2000.

JOSEPH, B., RAMTEKE, P.W., THOMAS, G., SHRIVASTAVA, N. Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. **Biotechnology and molecular biology review**, v.2, n.2, p. 039-048, 2007.

JUCY, Neiva. **Conheça o petróleo**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1986.

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

KATO, T., HARUKI, M., IMANAKA, T., MORIKAWA, M. KANAYA, S. Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil reservoir water and oil sands. . **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 55, p. 794-800, 2001.

KRISHNARAJU, A.V., RAO, T.V.N., SUNDARARAJU, D., VANISREE, M., TSAY, H., SUBBARAJU, G.V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **International journal of applied science and engineering**. V. 3, n.2, p. 125-134, 2005.

LAU, K.L., TSANG, Y.Y., CHIU, S.W. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Chemosphere**, v. 52, p. 1539-1546, 2003.

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

LHULLIER, C., HORTA, P.A., FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, 2006.

LOPES, V.R., FERNÁNDEZ, N., MARTINS, R.F., VASCONCELOS, V. Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extracts to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. **Marine drugs**, v.8, p. 471-482, 2010.

MABROUK, A. M., KHEIRALLA, Z. H., HAMED, E. R., YOUSSRY, A. A., ATY, A. A. A. E. Screening of some marine-derived fungal isolates for lignina degrading enzymes (LDEs) prodution. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 4, p. 591-599, 2010.

MADHAVI, V., LELE, S.S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v.4, n.4, p. 1694-1717, 2009.

MAGOT, M., OLLIVIER, B., PATEL, B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.77, p. 103-116, 2000.

MAGRINI, M.J. **Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas.** 2012. 107f. Dissertação de Mestrado, PG Genética e Biologia Molecular, IB, UNICAMP, Campinas, SP.

MALIK, Z.A., AHMED, S. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 650-658, 2012.

MARGESIN, R., HAMMERLE, M., TSCHERKO, D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. **Microbial ecology**, v 53, p. 259-269, 2007.

MENEZES, E.W., SILVA, R., CATALUÑA, R., ORTEGA, R.J.C. Effect of ethers and ether/etanol additives on the physicochemical properties of diesel fuel and engine tests. **Fuel**, v. 85, p. 815-822, 2006.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha energética brasileira: Exercício de 2014.** Ed. – Brasília: MME, junho de 2015. Disponível em: < http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+-+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2 > Acesso em: 16 fev. 2016.

MOHAJERI, L., AZIZ, H.A., ISA, M.H., ZAHED, M.A. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 893-900, 2010.

MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M., BIDOIA, E. D. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. Arch **Environ Contam Toxicol**, v. 68, p. 342-353, 2015.

NASTRO, R. A., SUGLIA, A., PASQUALE, V., TOSCANESI, M., TRIFUOGGI, M., GUIDA, M. Efficiency measures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons biorremediation process through ecotoxicological tests**. International Journal of Performability Engineering**, v.10, n. 4, p. 411-418, 2014.

NILADEVI, K.N., Ligninolytic Enzymes. In: NIGAM, P.S., PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. Springer Science + Business Media, 2009.

NKWELANG, G., KAMGA, H.F.L., NKENG, G.E., ANTAI, S.P. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro-organisms in tropical soil polluted with oily sludge. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.8, p. 1075-1080, 2008.

NUNES, B. S., CARVALHO, F. D., GUILHERMINO, L. M., STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

NYYSSÖNEN, M. **Functional genes and gene array analysis as tools for monitoring hydrocarbon biodegradation.** Dissertação Acadêmica. Departamento de ciências biológicas e ambientais, University of Helsinki. 2009.

OLIVEIRA, D.M. **Aplicação da técnica de solidificação/estabilização para resíduos oleosos da indústria petrolífera, utilizando solo argiloso e bentonita.** 2003. Dissertação de Mestrado, PG Engenharia Ambiental, Centro tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PANG, K., CHOW, R. K. K., CHAN, C., VRIJMOED, L. L. P. Diversity and physiology of marine lignicolous fungi in arctic waters: a preliminary account. **Polar Research**. v. 30, p. 1–5, 2011.

PASSARINI, M.R.Z., SETTE, L. D., RODRIGUES, M.V.N. 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, p. 564-570, 2011.

PEIXOTO, R.S., VERMELHO, A.B., ROSADO, A.S. Petroleum-degrading enzymes: biorremediation and new prospects. **Enzyme research**, 2011.

PEREIRA, A.R.B., FREITAS, D.A.F. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. Em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X., VERVOORT, J., GROTENHUIS, J.T.C., VAN GROENESTIJN, J.W. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. **Applied and environmental microbiology**. V. 68, n. 6, p. 2660-2665, 2002.

PURI, S., BEG, Q.K., GUPTA, R. Optimization of Alkaline protease production from *Bacillus* sp. By response surface methodology. **Current Microbiology**, v.44, p.286-290, 200
RAGHUKUMAR, C. Fungi from marine habitats: na application in bioremediation. **Mycology Research**, v. 104, p. 1222-1226, 2000.

RAGHUKUMAR, C., MOHANDASS, C., KAMAT, S., SHAILAJA, M.S. Simulatneous detoxification and decolorization os molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. **Enzyme and microbial technology**, v.35, p. 197-202, 2004.

RAHMAN, K.S.M., BANAT, I.M., THAHIRA, J., THAYUMANAVAN, T., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith, and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.

RAHMAN, K.S.M., THAHIRA-RAHMAN, J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., BANAT, I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, Tamilnadu, v.85, p. 257-261, 2002.

RIFFALDI, R., LEVI-MINZI, R., CARDELLI, R., PALUMBO, S., SAVIOZZI, A. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Water, air, and soil pollution**, v.170, p. 3-15, 2006.

RIZZO, A. C. L., LEITE, S. G. F., SORIANO, A. U., SANTOS, R. L. C., SOBRAL, L. G. S.. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. **Série Tecnologia Ambiental**. Centro de Tecnologia Mineral (CETEM). Rio de Janeiro, 2007.

RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. 2009. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Cárita Editora, Campinas, Brasil, 358 p.

ROMANELLI, M.F., SILVA, G.P., BORRELY, S.I. Redução da toxicidade do surfactante LAS tratado com feixe de elétrons. **Journal of the brazilian society of ecotoxicology**, v.1, n.2, p. 103-107, 2006.

SHARMA, S., L. & PANT, A. Crude oil degradation by a marine actinomycete *Rhodococcus* sp.. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 30, p. 146-150, 2001.

SHARY, S., RALPH, S. A., HAMMEL, K. E., New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6691-6694, 2007.

SOUZA, T.B. **Revisão da equação de cálculo de índice de cetano para as características do diesel comercializado no paraná.** 2008. Dissertação de Mestrado, PG Engenharia de processos térmicos e químicos, Curitiba, PR.

SRIVASTAVA, A., PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable & sustainable energy reviews.** V.4, p. 111-133, 2000.

STAT SOFT, INC. **STATISTICA for Windows** (computer program manual). Tulsa, OK: Stat Soft, Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK 74 104, 1995.

SYED, K., DODDAPANENI, H., SUBRAMANIAN, V., LAM, Y.W. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, p. 492–497, 2010.

TELES, D.R.S., AZEVEDO, A.E.G., SANTOS, C.P.L., Caracterização isotópica de águas de formação hipersalinas de um campo de petróleo da bacia do recôncavo, Brasil. **Revista brasileira de geofísica.** v. 28, n.2, p. 291-301, 2010.

TYAGI, M., DA FONSECA, M.M.R., CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v.22, p. 231-241, 2011.

URURAHY, A.F.P., PEREIRA JR,, N., MARINS, M.D.M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. **Boletim técnico da PETROBRÁS**, v. 41, p. 125-132, Rio de Janeiro, 1998.

US ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (EIA). **Oil: Crude and petroleum products Explained.** 2015. Disponível em: < http://www.eia.gov/energyexplained/index.cfm?page=oil_use > Acesso em: 30 de janeiro de 2016.

VANHAECKE, P., PERSOONE, G., CLAUS, C., SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.5, p. 382-387, 1981.

VASCONCELLOS, S. P. **Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da bacia de Campos (Pampo Sul).** 2006. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

VASCONCELLOS, S. P., DELLAGNEZZE, B. M., WIELAND, A., KLOCK, J. H., SANTOS NETO, E. V., MARSAIOLI, A. J., OLIVEIRA, V. M., MICHAELIS, W.The potential for hydrocarbon biodegradation and production of extracellular polymeric

substances by aerobic bacteria isolated from a Brazilian petroleum reservoir. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 1513-1518, 2011.

VASCONCELOS, M.R.S. **Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais.** 2014. Tese de doutorado, PG em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

VELMURUGAN, N.; LEE, Y.S. Enzymes from marine fungi: current research and future prospects. In: JONES, E.B.G.; PANG, K. **Marine fungi and fungal-like organisms.** Berlin: De Gruyter, 2012. p. 441-474.

VIDEIRA, A. **Lipases produzidas por fungos derivados de ambiente marinho : otimização, purificação e caracterização bioquímica**. 2014. Dissertação de mestrado em microbiologia aplicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual paulista "Júlio de Mesquita Filho".

WARIISHI, H., VALLI, K., GOLD, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 23688–23695, 1992.

WATANABE, K. Microrganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p. 237-241, 2001.

WEBER, F.J., HAGE, K.C., BONT, J.A.M. Growth of the fungus Cladosporium sphaerospermum with toluene as the sole carbono and energy source. **Applied and environmental microbiology.** v. 61, n. 10, p. 3562-3566, 1995.

WU, Y., LUO, Z., V., L.L.P., Biodegradation of antharecene and benz[a]anthracene by two Fusarium solani strain isolated from mangrove sediments. **Bioresource Techonology,** v. 101, p. 9666-9672, 2010.

YADAV, J.S., REDDY, C.A. Degradation of benzene , toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and environmental microbiology**. V. 59, n. 3, p. 756-762, 1993.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substratebinding site. **Protein Engineering,** v. 15: p. 147-52, 2002.

ZAHED, M.A., AZIZ, H.A., ISA, M. H., MOHAJERI, L., MOHAJERI, S. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9455-9460, 2010.

ZEIKUS, J.G. The biology of methanogenic Bacteria. **Bacteriological reviews**, v.41, n.2, p. 514-541, 1977.

ZHAO, X., WANG, Y., YE, Z., BORTHWICK, A.G.L., NI, J. Oil field wastewater treatment in Biological Aerated Filter by immobilized microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1475-1483, 2006.

ZHU, X., VENOSA, A.D., SUIDAN, M.T. **Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments.** U.S. Environmental Protection Agency (EPA). National Risk Management Research Laboratory, Cincinnati, July 2004.

ZINDER, S.H., CARDWELL, S.C., ANGUISH, T., LEE, M., KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digestor: *Methanothrix* sp. as na important aceticlastic methanogen. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796-807, 1984

ANEXO A – MATRIZ PLACKETT & BURMAN DE 20 ENSAIOS

Ensaios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	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	1
3	-1	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	1
5	1	-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	1
7	1	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	-1
9	-1	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	-1
11	-1	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	1
13	-1	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	1
15	-1	-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	-1
17	1	-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	1
19	-1	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	-1
21 (C)	0	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	0
23 (C)	0	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	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009.

ANEXO B – MATRIZ PLACKETT & BURMAN DE 16 ENSAIOS

Ensaios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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
3	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
5	-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
7	-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
9	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
11	-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
13	-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
15	-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
17 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009.

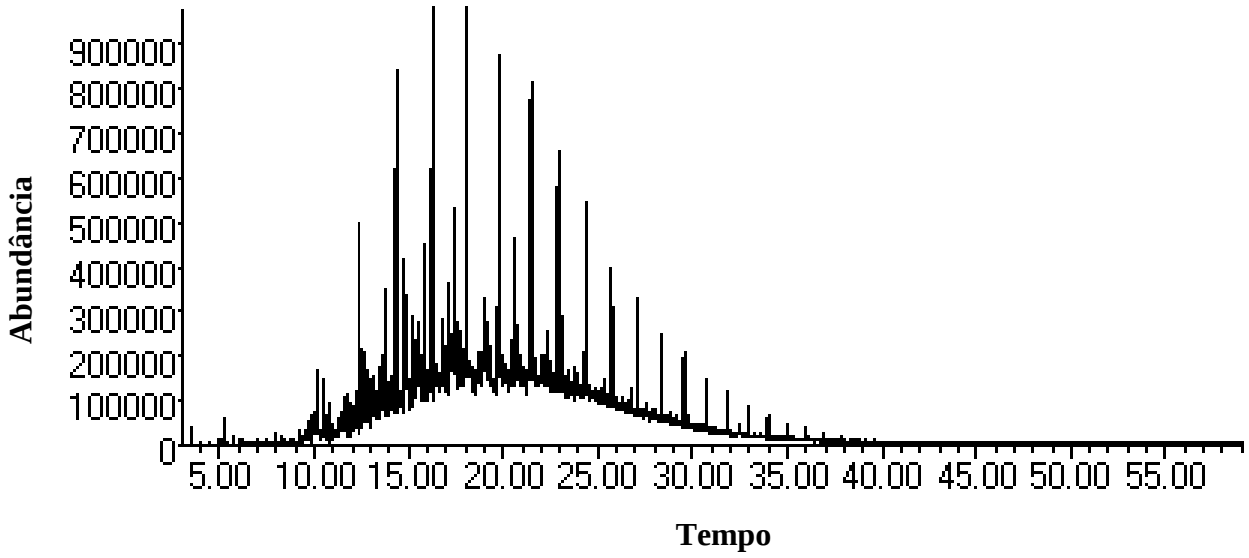
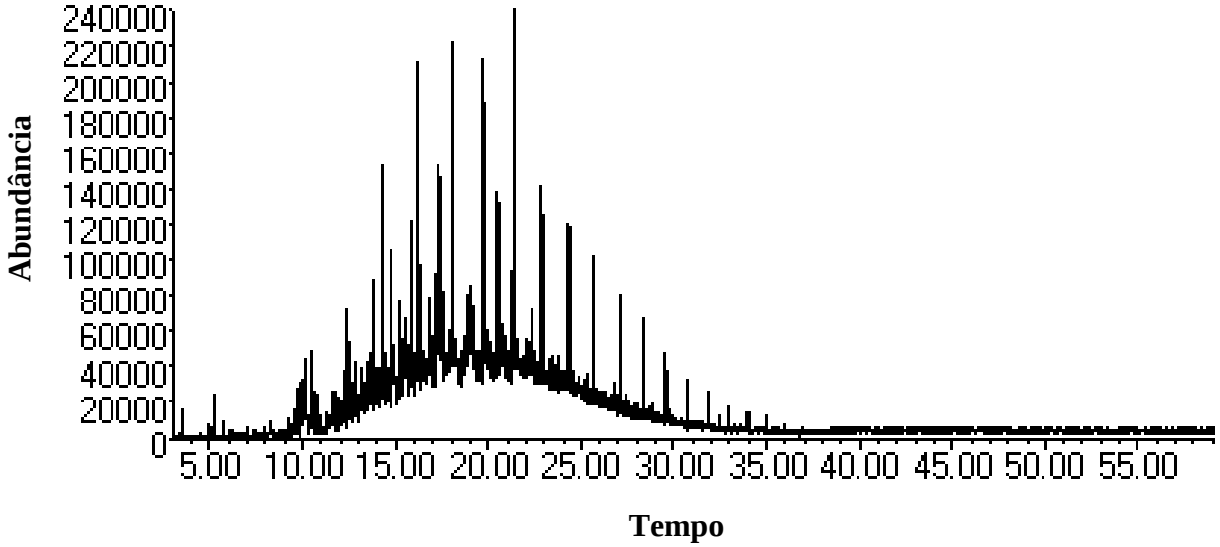
ANEXO C – MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Ensaios	**1**	**2**
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 (C)	0	0
10 (C)	0	0
11 (C)	0	0

Fonte: RODRIGUES & IEMMA, 2009.

APÊNDICE 1 – CROMATOGRAMAS DO DIESEL INCUBADO A 14 E 21 DIAS COM O CONSÓRCIO 6

(a) Perfil cromatográfico do diesel após 14 dias de incubação o consórcio 6



(b) Perfil cromatográfico do diesel após 21 dias de incubação o consórcio 6