

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/12/2018.

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

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS
POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS

GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

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

Dezembro - 2016

GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS POR
CONSÓRCIOS MICROBIANOS MARINHOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

RIO CLARO
2016

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

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

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: GABRIELA ALVES LICURSI VIEIRA

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

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

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

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

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

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

Dra. VERA MARIA VALLE VITALI
Instituto de Botânica

Rio Claro, 19 de dezembro de 2016

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

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

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

A minha cunhada querida;

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao Adriano pela ajuda com as análises de FTIR;

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

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

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

Minha eterna gratidão!

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

Chico Xavier

...TUDO PASSA...

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	– 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina
ASW	– Água do mar artificial
BaP	– Benzo[a]pireno
CBMAI	– Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria/UNICAMP
CONS	– Consórcio microbiano
CRM	– Central de Recursos Microbianos UNESP/RC
DCCR	– Delineamento Composto Central Rotacional
DEPC	– Dicarbonato de dietila
DO	– densidade óptica
EC	– <i>Enzyme Commission Number</i>
EC ₅₀	– Concentração efetiva
EPS	– Exopolissacarídeos
FTIR	– <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GO	– <i>Gene Ontology</i>
HPA	– Hidrocarboneto Policíclico Aromático
KEGG	– <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LiP	– lignina peroxidase
MA2	– ágar malte 2 %
MnP	– Manganês peroxidase
MO	– micro-organismos
NA	– Ágar nutriente
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	– Sequenciamento de nova geração
NR	– Não redundante
PB	– Plackett-Burman
PPM	– Partes por milhão
RBBR	– <i>Remazol Brilliant Blue R</i>
RIN	– <i>Integrity Number</i>
U/L	– Unidade enzimática por litro

SUMÁRIO

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

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

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

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

O presente trabalho foi dividido em três capítulos:

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

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

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

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

4. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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