



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas

CEZAR JÚNIO COELHO PARANHOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO CERRADO CULTIVADOS
EM PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL**

BRASÍLIA

Março 2024

CEZAR JÚNIO COELHO PARANHOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO CERRADO CULTIVADOS
EM PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Instituto de Ciências Biológicas (IB), da Universidade de Brasília (UnB) para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

BRASÍLIA

Março 2024

CEZAR JÚNIO COELHO PARANHOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO CERRADO CULTIVADOS
EM PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, do Instituto de Ciências Biológicas (IB), da Universidade de Brasília (UnB) para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

Brasília, 14 de março de 2024.

Banca Examinadora

Profº. Dr. LUIS HENRIQUE FERREIRA DO VALE (Presidente)

Profº. Dr. GILVAN CAETANO DUARTE

Profº. Dr. SEBASTIEN OLIVIER CHARNEAU

Profº. Dr. JAQUES MIRANDA FERREIRA DE SOUZA (Suplente)

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço a Deus, seu filho, Jesus Cristo, e a todos os Santos e Anjos para os quais eu rezo por me conceder muita sabedoria e espiritualidade para que eu chegasse neste momento importante da minha vida. Graças a isso, sou muito grato pela minha família, principalmente aos meus pais, Cezar Paranhos, Margarida Coelho Paranhos e minha irmã, Débora Coelho Paranhos.

Agradeço ao Professor Luis Henrique Ferreira do Vale por ter me acolhido tão bem durante o processo de mestrado, desde o momento da nossa primeira entrevista até agora, agradeço pela sua paciência, ensinamentos, pelo projeto e admiro muito a sua autenticidade, estou aprendendo e evoluindo muito com ele. Sou grato ao Professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, pela indicação dos fungos e por confiar em mim até o presente momento, agradeço aos ensinamentos que ele me proporciona e confio plenamente na sua vasta experiência. Agradeço ao Professor Helder Andrey Rocha Gomes, por sempre acreditar em mim, pela sua ajuda e apoio desde a época de graduação, estou feliz que esteja sendo citado neste trabalho.

Meus sinceros obrigados a todos da enzimologia: Rafael Ícaro, por ter me ajudado no laboratório sempre que precisei, Raul Lima, Tayná Frederico, Jéssica Fernandes, João Holanda, Rosa Loriano, Natan Sousa, Vinícius Cardoso, Jemima Aila, Helena Ipê, Carla Patrícia, Alencar Peixoto, Lucas Gasparotto, Artur Stranz, Augusto Leite, Fernando Brandini, Maria Clara Reis e Yasmim Folha. Quero que saibm que na atual dissertação existe o ensinamento de alguns, conselho de outros, dica de alguém e etc... Existe um pedaço de cada um de vocês, direta ou indiretamente nesta dissertação, obrigado pessoal! Espero também ter contribuído na formação de vocês de alguma forma. Agradeço também a professora Eliane Noronha pelos ensinamentos e pelos bons momentos. Agradeço a Clara Todorov e Taísa Godoy pelos protocolos de Lacase e MnP.

Agradeço especialmente as minhas alunas de iniciação científica (IC) Ana Clara Casimiro e Ariane Leandro, por me auxiliarem nessa caminhada, serem os meus braços esquerdo e direito. Nos últimos dois meses, nós ativamos um modo turbo, e percebi a evolução de vocês desde o início até o final dessa dissertação, espero que tenham aprendido muito comigo, assim como, aprendi muito com vocês.

Agradeço a professora Melissa Monteiro que foi minha professora de biologia no Ensino Médio e que agora eu a encontro no departamento algumas vezes, obrigado pelas dicas, conselhos e toda torcida que você emana para a minha pessoa e pelo meu projeto.

Agradeço ao Guilherme Sperandio, por sempre me auxiliar, mesmo que seja a distância, tem me ajudado muito, tenho a gratidão de também citá-lo neste trabalho. Agradeço ao Reynaldo Melo por todo suporte, paciência e ensinamento no LBQP,!! Sou grato pela companhia e ajuda da Maria Júlia Lima Gonçalves pelo apoio nessa jornada desde o início,

Agradeço também aos amigos do III simpósio, atualmente GestBioMicro: Eduardo Lima, Mayara Sousa, Jhon Eric e Felipe Fochat pela realização do III simpósio de Biologia Microbiana que foi um grande sucesso! Agradeço a Prof^a. Dra. Rita de Cássia, pela ótima coordenação no PPG-BioMicro, parabéns Rita !

Agradeço a minha grande amiga bióloga, Caroline Miranda Goulart, por não medir esforços para me ajudar e me escutar quando eu preciso.

Agradeço ao fomento da FAP-DF pelo apoio financeiro via projeto: Demanda Espontânea, número 00193.00001484/2021-91 e pelo oferecimento da bolsa fornecido pelo edital nº 005/2022.

“A ciência é TOTALMENTE coletiva”.

Autor desconhecido

RESUMO

Ao longo dos anos desastres com petróleo têm causado poluições e toxicidade aos ambientes marinhos e terrestres. Tendo em vista estes derramamentos, faz-se necessário reduzir os danos ambientais por meio de técnicas sustentáveis e ecologicamente corretas. Posto isto, a biorremediação pode ser grande aliada neste processo, uma vez que utiliza microrganismos, especialmente bactérias e fungos para degradar as longas cadeias de hidrocarbonetos desses poluentes. Os fungos dispõem de diversas enzimas extra e intracelulares para metabolizar compostos químicos pesados, quando expostos a ambientes estressantes. Os objetivos do presente trabalho visam bioprospectar fungos filamentosos do bioma Cerrado, e observar o seu crescimento em petróleo (PT) e óleo diesel (OD), seguindo-se pelas análises do secretoma. Foram testados 6 fungos, dentre os resultados de bioprospecção, observamos satisfatório crescimento de *Paecilomyces formosus* (CZJ1), *Clonostachys byssicola* (CZJ2) e *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3) em meios sólido e líquido. A partir desses resultados, os cultivos desses três fungos filamentosos foram direcionados para análise das proteínas e enzimas secretadas. Além disso, verificou-se a biodegradação dos hidrocarbonetos por meio do indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP). Os resultados demonstraram concentrações de proteínas secretadas totais em diesel de 23,14 µg/mL (*P. formosus*), 55,05 µg/mL (*C. byssicola*) e 183,61 µg/mL (*A. brasiliensis*), e no cultivo com petróleo de 62,09 µg/mL (*P. formosus*), 38,76 µg/mL (*C. byssicola*) e 51,70 µg/mL (*A. brasiliensis*). Assim como, constatou-se a atividade enzimática de manganês-peroxidase (MnP), na qual, *C. byssicola* apresentou 29,93 (U/mL) em cultivo com diesel, *P. formosus* e *A. brasiliensis* apresentaram 8,93 (U/mL) e 15,24 (U/mL) no cultivo com petróleo, respectivamente. Os resultados com DCPIP demonstraram descoloração total do corante em cultivo com diesel para *P. formosus*, *C. byssicola* e *A. brasiliensis* e um clareamento parcial da coloração azul para *P. formosus* e *A. brasiliensis* cultivados em petróleo, indicando biodegradação dos hidrocarbonetos presentes em ambos os óleos. Nota-se o potencial dos fungos citados para processos biorremediativos, uma vez que se constata a capacidade destes em utilizarem hidrocarbonetos presentes nas substâncias citadas como fonte de carbono e metabolizá-las para o benefício do seu ciclo de vida.

Palavras-chave: Biorremediação, Bioprospecção, Secretoma, Fungos filamentosos

ABSTRACT

Over the years, oil disasters have caused pollution and toxicity to marine and terrestrial environments. In view of these spills, it is necessary to reduce environmental damage through sustainable and environmentally friendly techniques. Bioremediation can be a great ally in this process, since it uses microorganisms, especially bacteria and fungi, to degrade the long hydrocarbon chains of these pollutants. Fungi have several extra- and intracellular enzymes to metabolize heavy chemical compounds when exposed to stressful environments. The aims of this work are to bioprospect filamentous fungi found in the Cerrado biome and observe their growth in petroleum (PT) and diesel oil (OD), followed by secretome analysis. Among the bioprospecting results, we observed satisfactory growth of *Paecilomyces formosus* (CZJ1), *Clonostachys byssicola* (CZJ2) and *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3) in solid and liquid media. Based on these results, the cultures of these three filamentous fungi were sent for analysis of the proteins and enzymes secreted. In addition, the biodegradation of hydrocarbons was verified using the redox indicator 2,6 dichlorophenol-indophenol (DCPIP). The results showed total protein concentrations in diesel of 23.14 µg/mL (*P. formosus*), 55.05 µg/mL (*C.byssicola*) and 183.61 µg/mL (*A. brasiliensis*), and in petrol culture of 62.09 µg/mL (*P. formosus*), 38.76 µg/mL (*C.byssicola*) and 51.70 µg/mL (*A. brasiliensis*). As well, the enzymatic activity of manganese peroxidase (MnP) was found, *C. byssicola* showed 29.93 (U/mL) in cultivation with diesel, *P. formosus* and *A. brasiliensis* showed 8.93 (U/mL) and 15.24 (U/mL) in cultivation with petroleum, respectively. The DCPIP results showed total decolorization of the dye in diesel culture for *P. formosus*, *C. byssicola* and *A. brasiliensis* and partial blue color clearing for *P. formosus* and *A. brasiliensis* grown in petroleum, indicating biodegradation of the hydrocarbons present in both oils. The potential of the above-mentioned fungi for bioremediation processes can be seen in their ability to use hydrocarbons present in the above-mentioned substances as a carbon source and metabolize them for the benefit of their life cycle.

Key-Words: Bioremediation, Bioprospecting, Secretome, Filamentous fungi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de Hidrocarbonetos..	14
Figura 2: Esquema da interação fúngica com metais tóxicos e hidrocarbonetos de petróleo.	17
Figura 3: Metabolismo de Antraceno e Pireno por Fungo Lignocelulítico..	18
Figura 4: Fluxograma Metodológico.	29
Figura 5: Crescimento de <i>Paecilomyces formosus</i> (CZJ1) em meio sólido	32
Figura 6: Crescimento de <i>Clonostachys byssicola</i> (CZJ2) em meio sólido	35
Figura 7: Crescimento de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (CZJ3) em meio sólido.	37
Figura 8: Cultivo de <i>P. formosus</i> (CZJ1) em meio líquido.	40
Figura 9: Crescimento no meio líquido de <i>C. byssicola</i> (CZJ2)	41
Figura 10: Cultivo de <i>A. brasiliensis</i> (CZJ3) em meio líquido..	43
Figura 11: Quantificação de proteínas de <i>P. formosus</i> (CZJ1).	44
Figura 12: Atividade Enzimática de MnP (U/mL).	51
Figura 13: Ensaio colorimétrico de DCPIP em tubos de ensaio.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meios de Cultura.....	25
Tabela 2: Coloração e Morfologia de <i>P. formosus</i> (CZJ1) em meio sólido.....	33
Tabela 3: Coloração e Morfologia de <i>C. byssicola</i> (CZJ3) em meio sólido.....	36
Tabela 4: Coloração e Morfologia de <i>A. brasiliensis</i> (CZJ3) em meio sólido.....	38
Tabela 5: Coloração e Morfologia de <i>P. formosus</i> (CZJ1) em meio líquido.....	40
Tabela 6: Coloração e Morfologia de <i>C. byssicola</i> (CZJ2) em meio líquido.....	42
Tabela 7: Coloração e Morfologia de <i>A. brasiliensis</i> (CZJ3) em meio líquido.....	43
Tabela 8: Quantificação de proteínas dos secretomas dos fungos <i>P. formosus</i> (CZJ1), <i>C. byssicola</i> (CZJ2) e <i>A. brasiliensis</i> (CZJ3).....	48

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
<i>Histórico do Derramamento de Petróleo.....</i>	12
<i>Propriedades Químicas do Petróleo e Óleo Diesel.....</i>	13
<i>Os Hidrocarbonetos, Metais na Membrana dos Fungos, Enzimas e Metabolismo</i>	15
<i>As enzimas oxidativas em petroderivados</i>	18
<i>Indicador DCPIP na degradação de hidrocarbonetos.....</i>	19
Os gêneros <i>Paecilomyces</i> , <i>Clonostachys</i> e <i>Aspergillus</i> : Taxonomia, Características e Estudos em Biorremediação de Petróleo e Derivados	21
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVOS	24
<i>Objetivo Geral.....</i>	24
<i>Objetivos Específicos</i>	24
1. METODOLOGIA	24
1.1 PROCEDIMENTOS REALIZADOS	24
1.1.1 <i>Petróleo e Óleo Diesel</i>	24
1.1.2 <i>Cultivo de Estoque e dos Grupos</i>	25
1.1.3 <i>Cultivo em meio Sólido</i>	26
1.1.4 <i>Cultivo em meio Líquido</i>	26
1.1.5 <i>Solução de Esporos</i>	27
1.2 <i>Coleta de Células</i>	27
1.3 <i>Cultivo com DCPIP</i>	28
1.4 <i>Ensaio de MnP</i>	28
1.3 <i>Preparo de Amostras</i>	28

1.3.1 Lise Celular.....	28
1.3.2 Quantificação de Proteínas	29
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.1 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO.....	31
2.1.1 Coloração e Morfologia de <i>Paecilomyces formosus</i> (CZJ1).....	31
2.1.2 Coloração e Morfologia de <i>Clonostachys byssicola</i> (CZJ2).....	33
2.1.3 Coloração e Morfologia de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (CZJ3).....	36
2.2 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO.....	39
2.2.1 Coloração e Morfologia de <i>Paecilomyces formosus</i> (CZJ1).....	39
2.2.2 Coloração e Morfologia <i>Clonostachys byssicola</i> (CZJ2).....	40
2.2.3 Coloração e Morfologia de <i>Aspergillus brasiliensis</i> (CZJ3).....	42
2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	44
2.3.1 Quantificação de Proteínas Intracelulares.....	44
2.3.2 Quantificação de proteínas do <i>Secretoma</i>	46
2.4) ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANGANÊS-PEROXIDASE (MnP):	49
2.5) BIODEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POR DCPIP:.....	52
CONCLUSÃO.....	56
PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

A biorremediação pode ser definida como um processo de reciclagem biológico, o qual se baseia na degradação ou desintoxicação de resíduos ambientais por meio de microrganismos (ABATENH et al., 2017).

A eficiência desta técnica torna-se bem-sucedida quando as condições ambientais possibilitam a atividade e o crescimento microbiano. Desse modo, a sua aplicação, frequentemente envolve a manipulação de parâmetros do ambiente, como por exemplo, pressão, temperatura, pH, taxa de oxigênio e umidade, permitindo o crescimento e a degradação em um ritmo mais acelerado (KUMAR; BISHT; JOSHI, 2011).

Os procedimentos com biorremediação baseiam-se no uso de plantas, denominada de fitorremediação ou aplicação de microrganismos, chamada microrremediação, ambas têm como principal objetivo a degradação de poluentes. A diversidade natural dos microrganismos garante benefícios em áreas poluídas, uma vez que utilizam vias para metabolizar compostos tóxicos variados. Além disso, os microrganismos possuem alta habilidade de adaptação a novos compostos, em virtude da rapidez do seu tempo de geração (VAKSMAA et al., 2023).

As comunidades microbianas são amplamente aplicadas para atuar em diversos cenários poluídos, dado que, aproveitam substâncias nocivas para o seu ganho de energia. O auxílio da engenharia genética possibilita que os metabólitos microbianos possam ser aperfeiçoados, viabilizando a deterioração de poluentes específicos (BORCHERT et al., 2021; JAISWAL; SINGH; SHUKLA, 2019; XIANG et al., 2021). Na limpeza de derrames industriais petrolíferos, a biorremediação acompanha duas principais estratégias: *in-situ* e *ex-situ*. Na primeira, a poluição é tratada no mesmo local onde ela ocorre, a segunda, retira-se a matriz poluidora da sua localidade, realizando o tratamento em outro espaço, geralmente nas refinarias (BISWAS; BANERJEE; BISWAS, 2022).

Nos casos de derramamento de petróleo, pode-se trabalhar com a bioaugmentação, aplicando os microrganismos direto no local da poluição ou emprega-se a técnica da bioestimulação, na qual estimula-se a comunidade microbiana natural, objetivando obter um desenvolvimento mais rápido e eficiente (SHARMA; SINGH, 2020). A bioestimulação pode ser definida como um tipo de remediação da qual melhora a degradação de poluentes por meio da manipulação de indicadores, sendo eles, alterações na aeração, controle de pH, temperatura e acréscimo de nutrientes. Essa estratégia garante privilégio na biorremediação, tendo em vista que usa microrganismos nativos adaptados ao solo ou água (MARGESIN; SCHINNER, 2001).

Por outro lado, a bioaugmentação, adiciona microrganismos que degradam hidrocarbonetos e outros compostos tóxicos para auxiliar as populações nativas de bactérias e fungos. A utilização dessa técnica, faz-se necessária quando a degradação por comunidades autóctones está insuficiente, encontram-se muito estressadas ou quando a população nativa de microrganismo se verifica baixa no complexo de poluentes presentes no petróleo (LEAHY; COLWELL, 1990a). Outros exemplos da biorremediação incluem o tratamento de águas residuais, tais como, limpeza de resíduos e corantes das águas de indústrias têxteis (IHSANULLAH et al., 2020), assim como, para limpar metais pesados de indústrias metalúrgicas (VERMA; KUILA, 2019).

Os fungos são organismos quimio-heterotróficos ubíquos, ou seja, adquirem sua fonte de energia a partir de compostos químicos e estão presentes em amplitude nos ambientes aquáticos e terrestres. A maioria são aeróbicos, sendo assim, sobrevivem melhor em ambientes com a presença de oxigênio (O_2), entretanto, podem ser encontrados em zonas com pouco O_2 , bem como, no trato digestório dos animais (MURA et al., 2019; PENG; VALENTINE, 2021; STIEF et al., 2014).

Na natureza, os fungos desempenham papel fundamental na decomposição de matéria orgânica, sobretudo em degradar madeira, incluindo celulose e lignina, produtos dos quais fazem parte da composição dos resíduos agroindustriais. Em razão da sua maquinaria intra, extracelular e capacidade de excretar ácidos, dispõem-se a metabolizar cadeias de compostos poluentes orgânicos e inorgânicos (DINIS et al., 2009; GOODELL; WINANDY; MORRELL, 2020; JANUSZ et al., 2017).

Tipicamente, enzimas fúngicas possuem especificidade relaxada pelo substrato (EL-GENDI et al., 2022), disponibilidade a diversos compostos como fonte de energia e carbono (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011). A otimização por biodegradação fúngica, está intimamente ligada as reações enzimáticas oxidativas, em especial, pelos conjuntos de peroxidases e oxidases (HOFRICHTER, 2002). Posto isto, os fungos são organismos muito proveitosos para fins biotecnológicos, destacando-se na biorremediação industrial e ambiental (HYDE et al., 2019).

Durante o tempo de degradação, os fungos podem liberar diversas enzimas extracelulares, além disso, os seus micélios penetram de forma profunda, aumentando a superfície de contato ao substrato, garantindo vantagem nos processos biorremediadores, visto que, bactérias não possuem esse tipo de estrutura (AL-HAWASH, 2018; GHOSAL et al., 2016; MAO; GUAN, 2016). No solo, os micélios atuam como uma “rodovia” para as bactérias no transporte de poluentes, melhorando sistemas de biorremediação (BANITZ et al., 2013).

Bactérias do gênero *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, são comumente utilizadas em processos de biorremediação (OJUEDERIE; BABALOLA, 2017; XU et al., 2018). Vale ressaltar que os gêneros *Oleispira*, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thallassolituus* e *Cycloclasticus*, são classificadas como bactérias hidrocarbonoclasticas, conhecidas pela sua habilidade em degradar hidrocarbonetos (YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007). Em ambiente marinho, esses procaríotos, toleram altas concentrações de sais, graças as suas características halofílicas, capazes de suportar estresses salinos (KHALID et al., 2021).

Os autores Rezaei Somee et al., (2018) reportaram a habilidade de bactérias halofílicas em consórcio com *Halomonas*, *Dietzia*, e *Arthrobacter*, sendo assim, estas foram capazes de degradar 40% de óleo diesel. Dell'anno et al., (2020) elucidaram que a cepa de *Halomonas* (SZN1) revela-se adequada para degradar hidrocarbonetos, dispondo de percentual de degradação em torno de 47% a 80% quando incubada em sedimentos contaminados por pireno, indeno-pireno, criseno e diabenzo-antraceno. Em outro estudo, certificaram-se que *Halorientalis sp.* diminui 57% de Hexadecanos em meio contendo 3.6M de NaCl, expressando competência na deterioração dessa estrutura química parafínica (ZHAO et al., 2017). A espécie *Acinetobacter baumannii* (cepa JYZ-03) reduziu 93,29% de óleo diesel queimado em um período de 7 dias, além disso, demonstrou alta tolerância em meio com o metal pesado Arsênio (As) (SU et al., 2023).

Em estudo de Wang et al., (2020), os autores avaliaram a diversidade bacteriana advindas de águas hidrotermais e sua competência na degradação de hidrocarbonetos, partindo-se do conceito que algumas bactérias podem viver na presença de hidrocarbonetos de fontes termais. Utilizou-se sondagem de isótopos estáveis baseadas em DNA contendo hidrocarbonetos marcados com ^{13}C para a identificação. As bactérias mais abundantes foram *Marinobacter* (36,3%), seguido de *Sulfurimonas* (17,7%) e *Halomonas* (24,3%). O Consórcio, após 60 dias, foi capaz de degradar 92-97% do total de *n*-alcanos e 76-78% do total de polihidroxicanoatos (PHAs).

Pesquisas validam a utilização de microalgas, especialmente dos gêneros *Selenastrum*, *Scenedemus* e *Chlorella*. Essas algas verdes, comprovam-se eficazes na deterioração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), tais como, pireno, fenantreno e naftaleno, da mesma forma, demonstram aptidão para a imobilização de metais (GARCÍA DE LLASERA et al., 2016; GHOSAL et al., 2016; LEI et al., 2007; TAKÁČOVÁ et al., 2014). As microalgas dispõem de estratégias para remover os compostos tóxicos, produzindo exopolissacarídeos, atuando na absorção de contaminantes na superfície celular,

transformando-os em formas menos complexas, reduzindo a toxicidade e biodisponibilidade do agente poluidor no ambiente (LIU; POHNERT; WEI, 2016). O contaminante liga-se aos exopolissacarídeos da parede celular, podendo ficar aderente, quelatado ou internalizado pelas fitoquelatinas, peptídeos sintetizados por enzimas, estimulados pela presença de metais pesados na água (PERALES-VELA; PEÑA-CASTRO; CAÑIZARES-VILLANUEVA, 2006; SHARMA et al., 2015). O uso de estirpes de microalgas, incluindo bactérias e fungos, podem potencializar os efeitos de biorremediação, recuperando áreas contaminadas, especialmente em meio aquático contaminados com petróleo e derivados (DELL' ANNO et al., 2021)

Flayyh e Al-Jawhari, (2014) coletaram amostras de solo contaminado por petróleo nos arredores do deserto iraniano. Encontraram-se, em abundância, os fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Penicillium funiculosum*. As culturas axênicas, livre de contaminação, apontaram um decaimento de 95% em hidrocarbonetos de petróleo com *A. niger*, após 28 dias de tratamento. As culturas mistas, contendo *A. Niger* e *A. fumigatus* exprimiram redução de 90% na perda de hidrocarbonetos. O consórcio misto, contendo todos os quatro fungos citados, demonstrou remoção de 70% deste composto tóxico.

Lamas de petróleo foram isoladas do campo petrolífero localizado em *Tahe, Xinjiang*, noroeste chinês. Observou-se o potencial de *Purpureocillium lilacinum* para degradação de hidrocarbonetos, identificados pelos autores como HF. O fungo foi cultivado por 30 dias em meio contendo petróleo. Os resultados demonstraram que HF degradou 100% de cicloalcanos, 21,2% de n-alcanos, 15,1% de anéis aromáticos e 14,5% de iso-alcanos (YANG et al., 2023).

O trabalho de Castro e Silva et al., (2019) aponta que Basidiomicetos verificam-se proveitosos na biorremediação. A espécie *Trametes cubensis* apresentou expressiva atividade da enzima lacase (12.000 UI/L) na degradação de HPAs e pireno. No trabalho de Atakpa et al., (2022), os autores testaram uma cepa fúngica (*Scedosporium sp. ZYY*) com habilidade de degradar petróleo, isolada e cultivada com estirpes bacterianas produtoras de biossurfactantes (*Acinetobacter sp. Y2*). Esta co-cultura revelou resultados significativos, uma vez que a tensão superficial do óleo reduziu de 63,12 mNm⁻¹ para 47,58 mNm⁻¹, exibindo secreção de biossurfactantes no meio. A redução de hidrocarbonetos no petróleo aumentou de 23,36% para 58,61% ao final de 7 dias de incubação. Ademais, a cromatografia gasosa por espectrometria de massa, revelou degradação significativa (P <0,05) entre 3789,27 µg/L e 940,33µg/L para n-alcanos e diminuição de 1667,33 µg/L para 661,5µg/L tratando-se de HPAs. Observa-se que a combinação entre fungo e bactéria produtora de biossurfactantes, contribuiu na degradação dos compostos tóxicos citados, melhorando a estratégia biorremediadora realizada pelos autores.

Os fungos utilizam os hidrocarbonetos como nutrientes e a contaminação atua como estimulante para o crescimento das populações fúngicas (MOHSENZADEH; CHEHREGANI RAD; AKBARI, 2012). A degradação realizada por microrganismos estimula a produção de ácidos orgânicos e produtos metabólicos (NWANCHUKWU; UGOJI, 1995). Desse modo, o ácido orgânico produzido auxilia na redução dos níveis de pH (OBOH et al., 2006).

Quanto ao consórcio entre fungos e outros microrganismos, Sa et al., (2020) afirmam que cultura de somente um fungo se verifica melhor do que culturas mistas, driblando o problema de competitividade entre as comunidades de fungos. Entretanto, outros estudos explanam que consórcios em conjunto, com outras comunidades microbianas, dispõem vantagens na degradação de hidrocarbonetos compostos (YUAN et al., 2021).

Histórico do Derramamento de Petróleo

Durante o processo de extração de petróleo e derivados são geradas grandes quantidades de energia e água, resultando em líquidos poluidores, como águas contaminadas despejadas a céu aberto, liberando gases tóxicos na atmosfera terrestre (ROGOWSKA; NAMIEŚNIK, 2010). As consequências da exploração *offshore* resultam em vazamentos de óleos nos dutos e nas plataformas, poluindo diretamente o ecossistema, especialmente, o marinho (EUZEBIO; RANGEL; MARQUES, 2019).

A partir dos anos 50, a poluição marítima começou a ganhar atenção ao redor do mundo, devido aos diversos casos de despejo de óleos por navios e grandes embarcações. A Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição do Mar por Óleo (OILPOL) reconheceu este potencial poluidor de práticas extrativistas marinhas e estabeleceu um conjunto de normas e competências que devem ser desempenhadas pela Organização Marítima Internacional (IMO) quando esta for requerida (NORONHA; FERREIRA; PINTO, 2018). As convenções definiram zonas de descarte, conseqüentemente, obrigando empresas multinacionais a cuidarem dos seus óleos derramados e aderirem a responsabilidade sócio ambiental na política de seus empreendimentos (IMO, 2023).

Em âmbito brasileiro, as leis e políticas nacionais, tornaram-se rigorosas ao longo dos anos nos processos de licenciamento ambiental e meio ambiente. A Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA) (Lei nº 6939/81, art. 9, IV) e a Lei do Petróleo (Lei nº 9479/97), assim como, o apoio de órgãos reguladores e executores, como por exemplo, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a Agência Nacional do

Petróleo (ANP) e o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) apresentam diversas regulamentações legais das quais regulam as atividades petrolíferas em território nacional (BLAJBERG SCHAFFEL et al., 2002). Tais leis, possuem o princípio da precaução, salientando alertar acerca dos riscos e perigos dos desastres ambientais. Por meio desse princípio, pode-se antecipar riscos para a saúde humana e ambiental no ambiente de extração de petróleo (MOTA, 2006).

O primeiro grande intenso derramamento a ser estudado foi o da Empresa *Exxon Valdez*, da qual, despejou aproximadamente 43mil m³ de petróleo bruto no mar do Alaska, estado Norte Americano em 1989. Os impactos foram devastadores, houve a redução do crescimento da população de peixes e deformidades anatômicas nos mesmos, promovidos pela ingestão de hidrocarbonetos (SHORT, 2017). Um caso alarmante para o mundo em 2010 dado pela explosão da plataforma americana *Deepwater Horizon* no golfo do México, resultou em 11 mortes e acidentes graves para 17 trabalhadores. Foram derramados cerca de 55.000 barris de petróleo, caracterizando o maior derramamento de petróleo na história marítima dos Estados Unidos da América (EUA) (BUCKINGHAM-HOWES et al., 2019).

Em fevereiro de 2023, o petroleiro *Princess Empress* afundou 800.000 litros de óleo industrial na costa oeste de Mindoro nas Filipinas, afetando comunidades de pescadores regionais, prejudicando sua economia e dificuldades no atendimento médico (THE GUARDIAN, 2023a). No mesmo ano, aconteceu o pior desastre ambiental da história do Peru, a empresa espanhola *Repsol*, responsável pela distribuição de energia no país, despejou mais de 10.000 barris de petróleo bruto no Oceano Pacífico depois de erros em descargas rotineiras no petroleiro. A mancha negra de petróleo espalhou-se por 25 praias, poluindo reservas marinhas (THE GUARDIAN, 2023b). No dia 30 de agosto de 2019, o Brasil impactou-se com a notícia do derramamento de petróleo no litoral pernambucano atingindo mais de 130 municípios em 11 estados da região Nordeste. De acordo com a Marinha brasileira, retiraram-se mais de 5.000 toneladas de petróleo bruto (SANTOS, 2023). No ano 2000, na Baía de Guanabara, um duto da Petrobrás rompeu-se, vazando cerca de 1,3 milhão de litros de óleo combustível nas águas, espalhando a mancha por 40 km² na costa carioca (ORTIZ, 2014).

Propriedades Químicas do Petróleo e Óleo Diesel

Conhecido como óleo cru, o petróleo pode ser definido como uma mistura de contaminantes orgânicos, hidrocarbonetos e impurezas inorgânicas, tais como, sais, água e sedimentos em geral. Apresenta-se de forma líquida, entretanto, pode ser uma emulsão de

componentes orgânicos e inorgânicos apresentando-se nas formas sólidas e gasosas. Os elementos inorgânicos, em sua maioria, são representados pelo enxofre elementar (fonte de 99% enxofre) e gás sulfídrico (H_2S). Os compostos classificados como não hidrocarbonetos, permanecem nas frações mais pesadas do óleo. Os hidrocarbonetos classificam-se de acordo com as formas de ligação dos átomos de Carbono (C), agrupados em: Aromáticos, Parafínicos, Naftênicos e Olefínicos (Figura 1A). Em cada tipo de petróleo, varia-se as proporções dessas substâncias, existindo quantidades de propano, metano e etano dispersos na mistura.

Considera-se os hidrocarbonetos sólidos, aqueles com mais de 18 átomos de C, ressaltando, as resinas e asfaltenos dos quais decompõem-se antes da sua vaporização. No petróleo podem ser encontradas impurezas, tais como derivados do enxofre (S) (benzotiofenos, dissulfetos, mercaptanas e sulfetos), derivados do O_2 (ácido naftênicos), nitrogênio (N) (piridina e pirrol), e metais: Arsênio (As), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), Sódio (Na), Vanádio (V) e Zinco (Zn).

Outras impurezas classificadas como orgânicas, são água, sais, areia e sedimentos. A figura 1B, revela um resumo dos constituintes do petróleo e a sua classificação, o mesmo é composto por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Os compostos instáveis, como as oleofinas, não são encontrados no petróleo, entretanto, são geradas durante o processo de refinamento, fazendo parte da constituição dos derivados e os não hidrocarbonetos, são os contaminantes (VILLELA BARCZA, 2023).

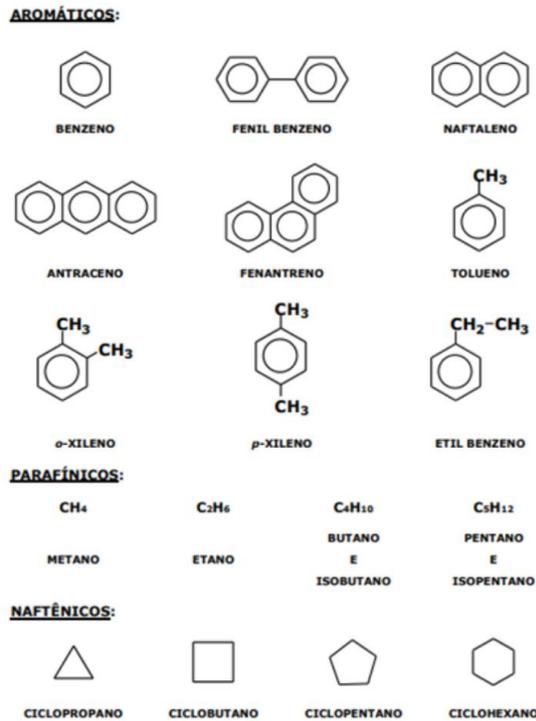
O óleo diesel deriva-se do petróleo, utilizado para motores do ciclo diesel com combustão interna e ignição por compressão. Este, compõe hidrocarbonetos (8 a 16C), assim como, apresenta em pequenas quantidades O_2 , N_2 e S. A sua formulação baseia-se na mistura com gasóleos, nafta pesada, diesel leve e pesado, advindos das etapas do refinamento do petróleo bruto.

Considera-se o óleo diesel *S-10*, como um combustível mais refinado, contendo baixo teor de S. Esse óleo exibe maior concentração de Hidrogênio (H), garantindo características solventes em impurezas (PETROBRAS, 2021)

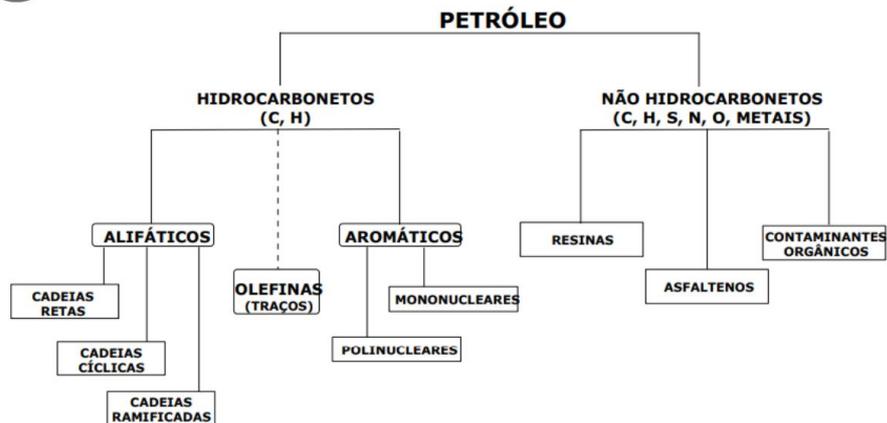
Figura 1: Exemplos de Hidrocarbonetos. **A)** Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos por anéis aromáticos, por esta razão, são mais difíceis de serem degradados. Os parafínicos e naftênicos são derivados do petróleo bruto. **B)** O petróleo constitui-se de hidrocarbonetos, classificados em alifáticos e aromáticos

(composto por anéis) e as oleofinas que são derivadas do refinamento. Os não hidrocarbonetos são compostos basicamente por metais e elementos orgânicos (C, H, S, N e O).

A



B



Fonte: Villela Barcza (2023)

Os Hidrocarbonetos, Metais na Membrana dos Fungos, Enzimas e Metabolismo

Os metais pesados As, Bário (Ba), Cádmi (Cd), Pb, Mercúrio (Hg), Ni e Zn são comumente encontrados no petróleo. Estes elementos estão presentes no processo de refino e

extração, bem como, na combustão de combustíveis em sistemas de aquecimento e transporte (KUYUKINA; KRIVORUCHKO; IVSHINA, 2018).

Em nível celular, os metais podem exercer a sua toxicidade de diversas maneiras: rompendo a membrana plasmática, atrapalhando a interação com células saudáveis nos sistemas homeostáticos, resposta ao estresse e inibição da ação enzimática (LI; LIU; GADD, 2020). Os cátions metálicos conseguem substituir os cofatores nas ligações metálicas essenciais no interior de uma enzima, por exemplo, Cd^{2+} pode substituir Zn^{2+} , ocasionando disfunções enzimáticas (SANDRIN; MAIER, 2003).

Os PHAs interagem com os componentes lipofílicos da membrana plasmática, alterando a permeabilidade, resultando em melhor penetração do metal tóxico dentro da célula fúngica (SHEN et al., 2005). A biodegradação de hidrocarbonetos por fungos torna-se possível devido às atividades de enzimas secretoras, tais como, lacases, manganês peroxidases, tirosinases, citocromo p450 monooxigenases e dehalogenases. À vista disso, afetam a especiação dos metais no momento da excreção, revertendo-os em uma diversidade de metabólitos, por exemplo, aminoácidos, sideróforos, proteínas extracelulares e ácidos orgânicos (LI; LIU; GADD, (2020).

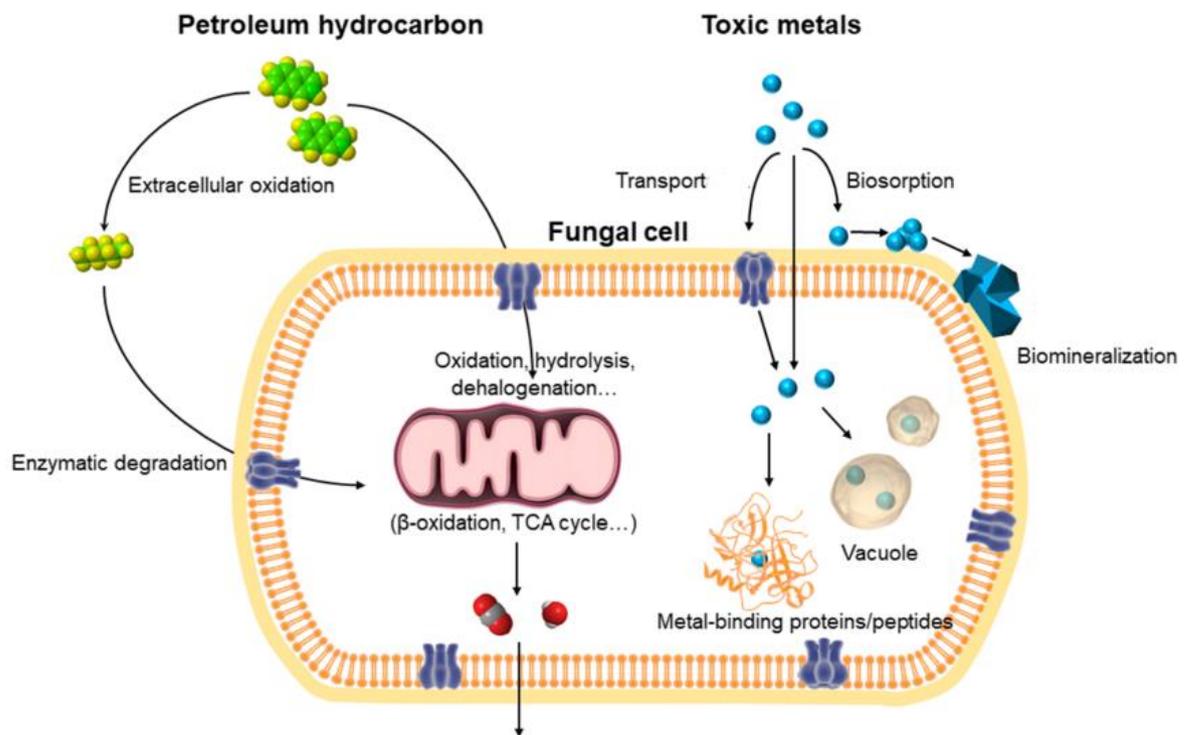
Tratando-se da degradação dentro da célula, as membranas ficam permeáveis aos poluentes orgânicos, degradados por enzimas intracelulares, bem como a Citocromo p450, redutor dehalogenases e nitroreduções (OSTREM LOSS; YU, 2018; TRIPATHI et al., 2017) subseguindo-se pelo metabolismo adicional, dado pela β -Oxidação e entrada no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) (LI; LIU; GADD, 2020). De outro modo, os fungos podem oxidar hidrocarbonetos de petróleo, como fenóis e aminas aromáticas de forma extracelular por meio da liberação de enzimas para a degradação fora da célula, produzindo lacases (MARTÍNKOVÁ et al., 2016), manganês peroxidases (MnP) (ZHANG et al., 2016) ou lignina-peroxidases (LiP) (FALADE et al., 2017).

Os mecanismos dos fungos que operam na mobilidade e toxicidade dos metais, incluem a produção de proteínas para a ligação de metais, precipitação orgânica, inorgânica, transporte ativo e compartimentalização intracelular. Eles podem precipitar metais nas superfícies das hifas pelo processo de oxidação (ex: óxidos, oxalatos, fosfatos insolúveis e carbonatos) comprovando-se eficácia na imobilização de metais, principalmente com Pb e Zn (FOMINA; GADD, 2014; LIANG et al., 2015; SUYAMUD et al., 2020).

De forma geral, as membranas dos fungos são permeáveis aos hidrocarbonetos ou compostos orgânicos oxidados através das enzimas extra e intracelulares, das quais, podem sofrer hidrólise, desalogenação, β -oxidação e entrada pelo ciclo TCA. A respeito dos metais

pesados, estes podem acumular-se na superfície das células dos fungos mediante bioadsorção, resultando-se na nucleação, acarretando na precipitação de biominerais. Alguns metais acumulam-se no interior celular devido ao transporte ativo da membrana, frequentemente, encontrados nos vacúolos. Tal como, podem ser sequestrados por peptídeos ou proteínas ligantes aos metais, ilustrado na figura 2 (LI; LIU; GADD, 2020)

Figura 2: Esquema da interação fúngica com os metais tóxicos e hidrocarbonetos de petróleo. A degradação intracelular dos poluentes orgânicos pode ser realizada devido a permeabilidade da membrana fúngica. Estes, são degradados por enzimas presentes no interior da célula, destacando-se a citocromo p450. Assim como, pode ocorrer a degradação extracelular pela liberação das enzimas lacases, LiP e MnP. Subsegue-se para o metabolismo pela β -Oxidação e Ciclo TCA. Além disso, os fungos podem precipitar os metais na superfície das hifas através do processo de oxidação, imobilizando-os, resultando no fenômeno da bioadsorção. Alguns metais acumulam-se no interior da célula por meio da difusão da membrana e são armazenados em vacúolos. De outro modo, podem ser sequestrados por peptídeos ou proteínas das quais ligam-se aos metais.



Fonte: Li; Liu; Gadd, (2020)

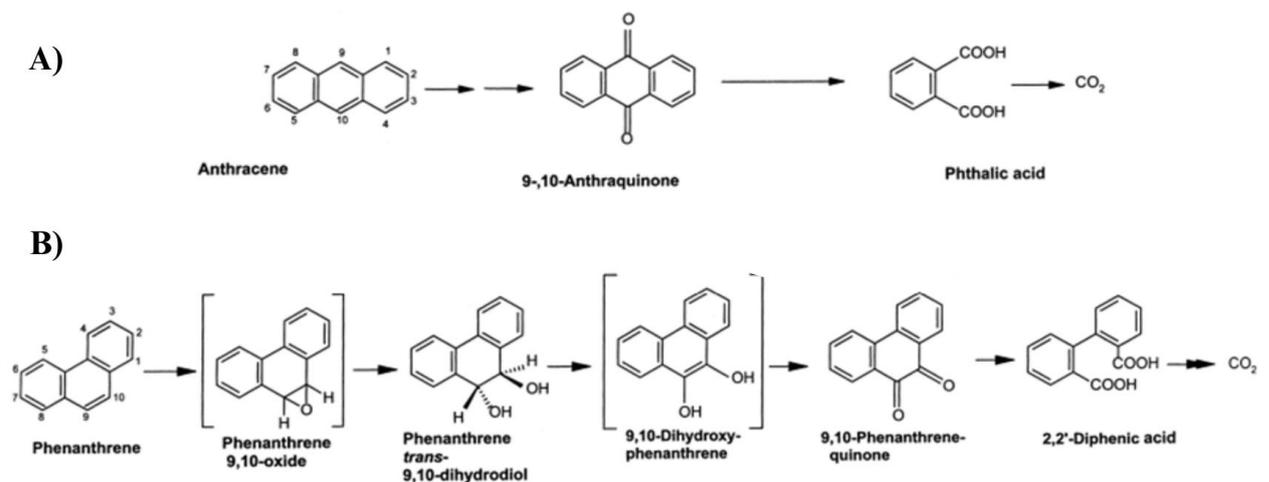
Fungos de podridão parda (*brown rot*) e branca (*white rot*) são qualificados na secreção de enzimas ligninolíticas, implicando na oxidação da lignina composta na madeira. Geralmente, as classes de enzimas na degradação são lacases e peroxidases. Oxidam-nos por meio de

radicais livres (hidroxilo), através da doação de um elétron, que irá oxidar os anéis presentes nos hidrocarbonetos. Esta reação gera uma seleção de PAH-quinonas e ácidos, ao invés de dihidrodíóis. A epóxido hidrolase e o citocromo P450 em fungos ligninolíticos também desempenham um papel significativo na hidroxilação inicial dos HPAs (AL-HAWASH, 2018).

A degradação de antraceno inicia-se pela via 9,10-antraquinona, subseguindo-se pela clivagem do anel em ácido ftálico, prosseguindo para dióxido de carbono (CO₂), como visto na figura 3A. As formas purificadas das enzimas LiP e MnP oxidam pireno, fluoreno, benzo[a]pireno e antraceno nas quinonas correspondentes (HAMMEL; GREEN; GAI, 1991).

Os HPAs composto até seis anéis aromáticos, são oxidados por reações de peroxidação por MnP (LAMAR; WHITE; ASHLEY, 2002). Por exemplo, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* metaboliza o fenantreno até em 9,10-quinona e depois cliva os anéis até chegar em ácido 2,2-difênico e liberando CO₂ (figura 3B).

Figura 3: Metabolismo de Antraceno e Pireno por Fungo Lignocelulítico. **A)** A degradação do hidrocarboneto antraceno começa pela via da 9,10-Antraquinona, posteriormente, a clivagem dos anéis geram o ácido ftálico, em seguida, a liberação de CO₂. **B)** *P. chrysosporium* metaboliza o hidrocarboneto fenantreno em fenantreno- 9,10-óxido até 9,10-dihidróxidofenantreno, após, ocorre a clivagem dos anéis, propiciando o ácido difênico, subseguindo-se, em gás CO₂.



Fonte: Figura original obtida de Cerniglia; Sutherland, (2009)

As enzimas oxidativas em petroderivados

Entre as fenoloxidase, encontram-se as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas como LiP, MnP e lacases (QUEIROZ DE SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE,

2019). Acerca das peroxidases fúngicas, a Manganês-peroxidase (MnP) desenvolve papel ecologicamente importante, especialmente na conversão de biomassa vegetal e degradação de compostos recalcitrantes (KELLNER et al., 2014). Tal enzima, é vastamente explorada no ramo biotecnológico, uma vez que realiza reações de biocatálises em corantes, bem como, na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (BECARELLI et al., 2019).

As enzimas lignocelulósicas são influenciadas por diversos fatores, como fontes de carbono e nitrogênio, condições de crescimento específicas e a depender dos efeitos de cada composto aromático (SCHNEIDER et al., 2018), assim como, depende-se da fisiologia, genética e ecologia de cada fungo (ELISASHVILI et al., 2010). A atividade catalítica dessa enzima requer a presença de cofatores, como metais e coenzimas, atuando em uma faixa de pH preferencialmente ácida. A falta desses parâmetros, pode afetar negativamente a atividade e produção da referida enzima (MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010). As enzimas oxidativas desempenham atuação fundamental na produção de biocombustíveis, em consequência da despolimerização e oxidação da lignina, garantindo a integridade dos polissacarídeos (MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010).

Kluczek-Turpeinen et al., (2003) relatam a liberação de polifenoloxidase em algumas espécies de *Paecilomyces* na literatura cinetífica, liberando-as, principalmente, em substratos lignocelulósicos. Conforme Kluczek-Turpeinen et al., (2007) a secreção de enzimas degradadoras de lignina contribui para a etapa central no metabolismo do carbono de *Paecilomyces spp.*, revelando-se como um ótimo fungo para investigação dos níveis de expressão destas enzimas oxidativas. Além disso, Mariano et al., (2008), elucida que o emprego de consórcios fúngicos pode ser uma boa alternativa para ampliar os sistemas enzimáticos, conduzindo a uma melhor metabolização dos poluentes. Dessa forma, um fungo pode complementar a capacidade de degradação do outro (MARIANO et al., 2008).

Becarelli et al., (2019), isolaram ascomicetos advindos de um rio comntaminado por combustíveis. Descobriram que o gênero *Lambertella sp.* revelou-se promissor na degradação de óleo diesel, secretando principalmente MnP para degradar o referido óleo. Os autores complementam que a atividade enzimática de MnP aumentou gradativamente durante os primeiros 15 dias, resultando em 15,0 U/gw unidades de atividade enzimática em relação ao peso produzido em gramas de peso seco da biomassa do fungo.

Indicador DCPIP na degradação de hidrocarbonetos

O 2,6 diclorofenol indofenol dihidratado ($C_{12}H_7NCl_2O_2$), conhecido como DCPIP, trata-se de um indicador do qual tem ação como receptor de elétrons em diversas reações químicas, especialmente as oxidativas (ROCHA, 2011).

O seu uso permite verificar em um período curto, o potencial de degradação de microrganismos quando cultivados em combustíveis e petroderivados (ROCHA, 2011). O emprego do DCPIP como teste qualitativo, permite observar a descoloração do indicador de forma visual, sem a necessidade de equipamentos, configurando-se como metodologia fácil e rápida para screenings em geral (ROCHA, 2011). Sendo assim, é possível observar indiretamente a oxidação realizada pelos microrganismos, quando inseridos em fontes de carbono, nas quais há transferência de elétrons para a extração de energia de compostos orgânicos, como O_2 , Nitrato (NO_3^-) e Sulfato (SO_4^{2-}), descolorindo o corante de tom azulado (forma oxidada) a incolor (forma reduzida) apontando a capacidade de bactérias e fungos em utilizar hidrocarbonetos como substrato (ROCHA, 2011).

No trabalho de Souza et al., (2005) selecionaram leveduras e bactérias com o intuito de observar a degradação de óleo diesel, querosene, gasolina e *bunker* (combustível para navios) observam, através do DCPIP, ação oxidante destes microrganismos em todos os combustíveis citados. Gomes (2004) afirmou que os fungos filamentosos *A. tamaritii* e *P. griseofulvum* demonstraram menor tempo de mudança do indicador DCPIP, com apenas 14 horas de contato com o corante, ressaltando a velocidade de degradação de hidrocarbonetos de tais fungos.

Silva et al., (2022), isolaram os fungos dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Talaromyces sp.* e *Trichoderma sp.* em sedimentos de Mangues no estado de Pernambuco, contaminados com petróleo do derramamento ocorrido em agosto de 2019 na costa nordestina. Primeiramente, os microrganismos foram aclimatados em óleo de motor queimado, em concentrações de 1 a 20% em meio contendo peptona, com o intuito de acostumá-los aos petroderivados. Constatou-se o crescimento deles em um período de 72 horas.

Os fungos com crescimento em 20% foram escolhidos para os testes de biodegradação em querosene/óleo diesel juntamente com o meio *Bushnell Haas* e o indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), reagente utilizado para detecção de receptor de elétrons, do qual muda de cor no meio de cultura, seguindo-se de azul até incolor (SILVA et al., 2022a).

Desta forma, a biodegradação de petroderivados no meio *Bushnell*, agregado aos isolados fúngicos, demonstrou após 48 horas, biodegradação de 50% aos referidos, exceto *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.*, ostentando 68,1% e 34,1%, respectivamente. Entretanto, após 72 horas, houve melhoras nos resultados, atestou-se valores de 75% no consumo de

hidrocarbonetos quanto os fungos retratados, exceto *Aspergillus sp.* que atingiu 88,4% de degradação em óleo diesel e querosene (SILVA et al., 2022a).

Os gêneros *Paecilomyces*, *Clonostachys* e *Aspergillus*: Taxonomia, Características e Estudos em Biorremediação de Petróleo e Derivados

A distribuição do gênero *Paecilomyces* no planeta Terra está bem distribuída em ambientes marinhos e terrestres. Da mesma forma, encontram-se em diversos seres vivos, tais como, animais, plantas e frutos (ANDRADE, 2020). A taxonomia de *Paecilomyces formosus*, classifica-o pertencente ao filo dos Ascomicetos, representado pelo subfilo *Pezizomycotina*, da classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae*, ordem *Eurotiales* pertencente à família *Trichocomaceae* (SAKAGUCHI M, 2023).

Bento e Gaylarde (2001) demonstraram o crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* em diesel puro (B0), biodiesel (B100) e a mistura de ambos (B7), como única fonte de Carbono e energia, em um período de 60 dias. Em B0 e B7, houve relevante produção de biomassa ($p < 0.05$), aumentada principalmente depois dos 21 dias, em concentrações entre 10^4 e 10^6 esporos/ml (GASSEN et al., 2015). No meio mineral mínimo (0.7 KCl g/L^{-1} , $2.0 \text{ KH}_2\text{PO}_4 \text{ g/L}^{-1}$, $3.0 \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \text{ g/L}^{-1}$, $1.0 \text{ NH}_4\text{NO}_3 \text{ g/L}^{-1}$, $4.0 \text{ MgSO}_4 \text{ g/L}^{-1}$, $0.2 \text{ FeSO}_4 \text{ g/L}^{-1}$ e $0.2 \text{ MnCl}_2 \text{ g/L}^{-1}$) a biomassa na interface óleo-água aparentada em B7e B100 foi melhor do que em B0. A análise infravermelha pôde confirmar uma redução da fração carbonilada reduzida, assim como diminuição de ácidos graxos na mistura e biodiesel isolado. Avaliaram-se a capacidade de alguns fungos crescendo em diesel metropolitano e meio mineral *Bushnell-Haas*, demonstrando que *P. variotii* não teve crescimento expressivo em diesel puro (BENTO; GAYLARDE, 2001).

Daâssi e Qabil Almaghribi (2022) afirmam que os microrganismos podem degradar os Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTPs), bem como, mineralizá-los a depender da taxa de acessibilidade, transferência para a célula, absorção e metabolismo de cada fungo. Simulação do solo contendo *Paecilomyces formosus* revelou resultado positivo quanto a taxa de degradação ($0,059 \text{ dias}^{-1}$), demonstrando um bom tempo de meia-vida, de 11,65 dias, considerado baixo pelos autores. Daâssi e Almaghribi (2021), afirmam que após 60 dias de incubação, o fungo *Paecilomyces formosus* (KB4) registrou taxa de degradação de $92 \pm 2.35\%$ em cultivo contendo HTPs. Quando inserido em co-cultivo com *Lecythophora* (*Conoichaeta*) (LB3) resultou $85.14 \pm 2.21\%$ na perda destes hidrocarbonetos, verificaram que *P. formosus* apresentou bastante atividade da enzima lipase.

Clonostachys apresenta-se como telemorfos correlato ao gênero, classificado na ordem *Hypocreales*, inserido na família *Bionectriaceae*. Essas espécies estão presentes nos solos, assim como, serrapilheira recém caídas, das quais, não foram colonizadas por fungos, podendo apresentar estilo de vida parasitário (SCHROERS, 2001). Em razão do seu micoparasitismo, estes fungos apresentam grande potencial para controle biológico (GOMES et al., 2017). O fungo *Clonostachys byssicola* ocorre amplamente nos biomas Cerrado e Amazônia (MOREIRA et al., 2016).

Em sua fase assexuada, *Clonostachys* revela massa conidial de cor branca, também pode exibir estruturas chamadas de esporódóquios, das quais o fungo exibe esporos ordenados em cadeias entrelaçadas (SCHROERS, 2001; SCHROERS et al., 1999). A fase sexuada deste mesmo fungo, posteriormente chamado de *Bionectria Speq.*, está presente, geralmente, em cascas de árvores mortas, promovendo nelas, um estroma erumpente e formando peritécios, sendo envelopes de frutificação (ascos) de bolores, cogumelos e líquens agrupados. Na natureza, ostentam coloração em tons de laranja, marrom e branco (SCHROERS, 2000).

Aspergillus brasiliensis pertence ao filo *Ascomycota*, inserido na ordem *Eurotiales*. possui distribuição diversificada nos solos brasileiros e ao redor do planeta, comumente encontrado em solo Norte-Americano, australiano e holândes. Este fungo compreende a seção *Nigri*, da qual, apresentam *Aspergillus* com esporos de cor preta, dos quais seus componentes são muito similares, dificultando trabalhos taxonômicos (SPERANDIO, 2022). Esta mesma seção é dotada de diversos fungos para interesse comercial, médicos e ecológico, abrange cerca de 27 espécies, sobressaindo-se: *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *A. niger*.

Por compartilharem a mesma seção, *A. niger* e *A. brasiliensis* são facilmente confundidos na literatura. Ambos, dotam de alta familiaridade genética, pois estão próximos na classificação filogenética para a seção *Nigri* (VESTH et al., 2018). *A. brasiliensis* é conhecido por produzir enzimas lignocelulolíticas de interesse para as indústrias (MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; PEDERSEN et al., 2007). Varga et al., (2007) elucida que o mesmo não produz micotoxinas e nem causa patogenia, como por exemplo, aspergilose. Além disso, exprimem capacidade de produzir proteases quando cultivado em substratos de agroindústrias (CHIMBEKUJWO; JA'AFARU; ADEYEMO, 2020; NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

Os trabalhos acerca de fungos filamentosos ligninolíticos elucidam que os PHAs, provavelmente, são degradados por meio de epóxido hidrolases, monoxigenaes do citocromo p450 e enzimas ligninolíticas, tais quais, conduzem à uma ótima mineralização deste composto (BEZALEL; HADAR; CERNIGLIA, 1997). Do mesmo modo, Machín-Ramírez et al., (2010) verificaram que o uso de *A. niger* e *Trichoderma harzianum* demonstraram eficácia na

degradação de pirenos. *A. niger* asseverou ser capaz de realizar clivagem de antracenos, produzindo ácido gentísico (PARSHIKOV; WOODLING; SUTHERLAND, 2015) e Papagianni (2007) declara que este fungo é conhecido por produzir ácido cítrico em processos industriais.

Lotfinasabasl; Gunale; Rajurkar, (2012) isolaram *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus terreus* e *A. niger* de amostras do solo em zona de Mangue nas cidades de *Alibaug* e *Akshi, Maharashtra*, Índia. Os pesquisadores objetivaram avaliar as estirpes dos fungos citados, observando o diâmetro do seu crescimento em diferentes concentrações de querosene, sendo elas, de 5 a 20% (v/v). À medida que os níveis de querosene aumentavam, os diâmetros fúngicos diminuía, exceto com *A. niger*, do qual, apresentou maior eficiência de crescimento em 20%. Mittal e Singh (2009) sugeriram que *A. niger* realiza biodegradação das frações de alcanos derivadas do petróleo bruto, visto pelo cromatograma gasoso (GC), sugerindo o esgotamento das parafinas comumente encontradas.

Em estudo de Sánchez-Vázquez et al., (2018), *Aspergillus brasiliensis* produziu uma proteína emulsificante (EP), tratado em um campo elétrico e cultivado em biorreator. Na produção dessa proteína, necessitou-se de uma fonte de carbono hidrofóbica, sendo essas, PHAs e hidrocarbonetos alifáticos. Os resultados constataram que a EP apresentou 19,5% da proteína total, na qual, sua purificação aumentou em sete vezes a atividade emulsificante (EA). A emulsificação aumentou em 19% nos ambientes com pH 7 a 11, além disto, a presença de sal não afetou efetivamente a EA.

Ismail et al., (2023) testaram *A. brasiliensis* na remoção das concentrações de benzo[a]pireno em cultura de bateladas, regulando-se as condições de pH. Deduziu-se, que a concentração ótima de pH foi de 6,0 em 40mg/l de benzo[a]pireno, diminuindo-o em 44,14%.

No mesmo trabalho, utilizou-se a bactéria *Sphingobacterium spiritivorum*, detectando-se um crescimento de 4,37E+07 CFU/mL e consumo de 38,98% de benzo[a]pireno nas mesmas condições da cultura em bateladas. O fungo revelou-se mais promissor na retirada de benzo[a]pireno comparado a bactéria (ISMAIL et al., 2023).

JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as atividades poluidoras dos derramamentos de petróleo e derivados, algumas técnicas podem ser insuficientes na remoção desses poluentes, fazendo com que os mesmos continuem prejudicando a saúde humana e ambiental. A partir dessa perspectiva, torna-

se essencial pesquisar alternativas sustentáveis e ambientalmente corretas, sendo uma delas, a biorremediação.

Sendo assim, a biorremediação por fungos faz-se necessária uma vez que estes seres vivos possuem capacidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo e derivados, por meio de liberação de enzimas extra (ex: Lacases, MnP e LiP) e intracelulares (ex: Citocromo p450 e nitroreduases). A proteômica torna-se ferramenta essencial neste processo para descoberta das proteínas e compreensão do metabolismo desses microrganismos quando estão consumindo petróleo e óleo diesel.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Testar a capacidade de crescimento populacional e biodegradação de petróleo e diesel S-10, como fonte de carbono de fungos filamentosos encontrados no bioma Cerrado.

Objetivos Específicos

- Bioprospectar fungos filamentosos em cultivos com petróleo e óleo diesel;
- Analisar a degradação do petróleo por meio de testes de degradação de hidrocarbonetos;
- Avaliar atividade enzimática de enzimas das quais participam de processos oxidativos;
- Avaliar a quantificação de proteínas extra e intracelular destes fungos filamentosos bioprospectados em cultivos com petróleo e óleo diesel.

1. METODOLOGIA

1.1 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

1.1.1 Petróleo e Óleo Diesel

O Petróleo utilizado neste trabalho foi fornecido pelo LePETRO (Excelência em Geoquímica, Petróleo e Meio Ambiente) do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia (Salvador – BA), Recôncavo Baiano. Coletado em 18/08/2017- Campo Dom João e

pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (local de amostragem: T0-61007; Solicitante: Tanque em carga; Tipo de amostragem: 1 metro; data: 23/8/2022, hora do envase: 13:38. Fornecido por: Janaína Paixão-UFPE).

O óleo diesel S-10 foi adquirido via compra em posto de gasolina Petrobrás.

1.1.2 Cultivo de Estoque e dos Grupos

Os fungos filamentosos *Paecilomyces formosus* (CZJ1), *Clonostachys Byssicola* (CZJ2) e *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3) foram adquiridos da Micoteca do Departamento de Enzimologia da Universidade de Brasília-UnB, sob coordenação do Professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

Realizou-se o repique dos fungos citados, em meio de cultura sólido, sendo eles: Extrato de Malte, Extrato de Levedura, Dextrose e Ágar (MYG), Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Peptona-Dextrose-Ágar (PDA). Os meios abordados, são dotados de Dextrose, 4% para PDA e 2% para os meios MYG e BDA, considerando a proporção de 1 litro. Os fungos *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3) cresceram em incubadora tipo câmara de germinação (TE-4013-TECNAL) na temperatura programa de 28°C a 29°C, durante 7 dias. O fungo *C.byssicola* (CZJ2) cresceu fora da BOD durante 15 dias.

Preparou-se o cultivo dos respectivos grupos, em meio sólido e líquido, consistidos em: Controle Positivo (C+), Controle Negativo (C-), Teste 1 (T1) e Teste 2 (T2). Implementou-se somente o cultivo em Meio Mínimo (MM), caracterizando o controle negativo (C-), composto por: KH_2PO_4 ; K_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ajustando-se o pH no valor 7,0, nas formas líquida e sólida.

Realizou-se os testes, enriquecendo-os com óleo diesel (OD), e petróleo (PT) a 1%, sendo estes os T1 e T2, nessa ordem, juntamente com o meio mínimo. Aqueceu-se o petróleo em banho Maria a 80°C para auxiliar na solubilidade e sucção da micropipeta. Seguiu-se os mesmos procedimentos do cultivo de estoque para realização do controle positivo (C+). Os materiais foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1: Meios de cultura e suas respectivas composições e concentrações na proporção de 1,0L. Nos casos de cultivo em meio líquido, retirou-se o ágar da composição. Os meios dos quais não necessitem do ajuste de pH, estão representados pelo “X”.

Meio de Cultura	Composição e Concentração	Ajuste de pH
MYG (<i>P. formosus</i>)	Extrato de Malte (2%) Extrato de Levedura (0.2%) Dextrose (2%) Ágar (1.5%)	X
BDA (<i>C. byssicola</i>)	Batata (200g) Dextrose (15g) Ágar (15g)	X
PDA (<i>A. brasiliensis</i>)	Peptona (10 g.L ⁻¹) Dextrose (40 g.L ⁻¹) Ágar (15 g.L ⁻¹)	5.6
Meio Mínimo	KH ₂ PO ₄ (7,0 g.L ⁻¹) K ₂ HPO ₄ (2,0 g.L ⁻¹) MgSO ₄ .7H ₂ O (0.8 g.L ⁻¹) (NH ₄) ₂ SO ₄ (1,0 g.L ⁻¹) Ágar (15 g.L ⁻¹)	7,0

1.1.3 Cultivo em meio Sólido

Em cultivo contendo ágar, realizou-se, 297 ml de MM mais 3 ml de OD e PT a 1%, totalizando um volume final de 300 ml de Meio de Cultura (MM + OD/PT 1%) para cada um dos grupos, controle negativo (C-), óleo diesel (T1) e petróleo (T2). Para o controle positivo (C+) fez-se 200 ml de meios dotados com dextrose (MYG, BDA e PDA), seguindo-se os mesmos procedimentos do cultivo em estoque.

Todos os grupos foram cultivados com 7 dias em temperatura 28°C, exceto *C. byssicola* (CZJ2) no qual foi cultivado fora da BOD. Os materiais foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Todo o procedimento foi realizado em triplicata

1.1.4 Cultivo em meio Líquido

No preparo sem a presença de ágar, separou-se 12 *Erlenmeyers* com volume de 250 ml, inoculando-se 50 ml de volume total nos mesmos (49.5 ml de MM + 0.5ml de OD/PT 1%)

para controle negativo (C-), óleo diesel (T1) e petróleo (T2). A realização do controle positivo (C+), seguiu-se igualmente ao processo com meio de cultura contendo dextrose (MYG, BDA e PDA), em *Erlenmeyers* de mesmo volume, inseridos 50 ml destes meios.

Estabeleceu-se agitação de 90 rotações por minuto (rpm) em *Shaker (New Brunswick Benchtop Incubator Shaker E24, Eppendorf ®)* com o intuito de promover uma baixa movimentação, impedindo que o petróleo não ficasse aderido nas adjacências dos *Erlenmeyers*, todo o processo citado foi realizado em triplicata. Todos os grupos foram cultivados com 7 dias em temperatura 28°C, exceto *C. byssicola* (CZJ2), fora da BOD.

Os materiais foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. O procedimento pode ser visualizado na figura 4 (etapa A). Todo o procedimento foi realizado em triplicata

1.1.5 Solução de Esporos

Adicionou-se, para ambos os cultivos, 1ml de solução de esporos, proveniente da raspagem dos fungos em cultivo de estoque. Em culturas com ágar, aplicou-se o mesmo processo de incubação para os fungos *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3), ou seja, em câmara de germinação, enquanto *C. byssicola* (CZJ2) foi exposto externo à BOD.

Utilizou-se a Câmara de *Neubauer* com objetivo de contar e estimar a concentração de esporos a serem inseridos nos cultivos, estabelecendo-se concentração em torno de 10^7 esporos/ml.

1.2 Coleta de Células

Na etapa B (Figura 4), em relação ao meio líquido, utilizou-se sistema de filtração a vácuo, acompanhada de *Kitassatos*, funil de *buchen* e papel de filtro *Whatman n°5*. Colheu-se os micélios retidos na superfície do filtro, introduzindo-os em microtubos de 2,0 ml. Conservou-se as células em *ultrafreezer -80°C*.

Assim como, coletou-se 25 ml do filtrado, armazenando-os em tubos cônicos de 50 ml, guardando-os em *freezer -20°C* (Figura 4: etapa B). Os micélios do meio líquido foram coletados com o auxílio de espátula de aço inoxidável estéril. Neste processo, materiais e vidrarias foram autoclavados a 121°C por 20 min. Todo o procedimento foi realizado em triplicata

1.3 Cultivo com DCPIP

Os fungos foram cultivados em tubos de ensaio de 10mL, todos acompanhados pelo reagente redox 2,6 diclorofenol-indofenol (DCPIP), do qual indicou indicará degradação dos hidrocarbonetos através da descoloração do reagente, seguindo-se pelo controle negativo (inóculo fúngico + meio mínimo + DCPIP), testes T1 (inóculo fúngico + meio mínimo + DCPIP+ óleo diesel 1%), teste T2 (inóculo fúngico + meio mínimo + DCPIP + petróleo 1%). Incubou-se os tubos por 7 dias a 28°C em agitação de 150 rpm, sob condições escuras para evitar a fotooxidação do reagente (Figura 4: DCPIP). Todo o procedimento foi realizado em triplicata

1.4 Ensaio de MnP

Realizou-se análise da atividade de enzimas extracelulares secretadas pelo fungo citado nos respectivos cultivos: controle positivo (C+), controle negativo (C-), óleo diesel (T1) e petróleo (T2). A enzima Manganês-Peroxidase (MnP) foi determinada por meio da oxidação do vermelho de fenol 0.1%, acompanhada da solução reagente (tampão succinato de sódio [250 mM], MnSO₄ [2mM], lactato de sódio [250 mM], albumina sérica bovina 0,5% e H₂O₂ [2mM]). As amostras foram incubadas a 30°C e lidas em espectrofotômetro a 610 nm (KUWAHARA et al. 1984) (Figura 4: C1.1.2). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

1.3 Preparo de Amostras

1.3.1 Lise Celular

As células coletadas do meio líquidos (Figura 4: C1) foram acondicionadas em microtubos com tampa de rosca 2ml com 400 µl de tampão de Lise LB (SDS 4%, 100mM de Tris-HCL, pH 7.6) adicionado um tablet inibidor de protease (*ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail- ROCHE®*), juntamente com 200 µl de Beads 0.5 mm (*Disruptor Beads 0.5mm-Scientific Industries ®*), totalizando um volume final de 600 µl (Figura 4: C2). Seguiu-se com a disrupção das células em *Bead Beater* (Figura 4: C3) durante 5 min, centrifugou-se as amostras por 15 min a 23°C em 6000 gravidades (g) (Figura

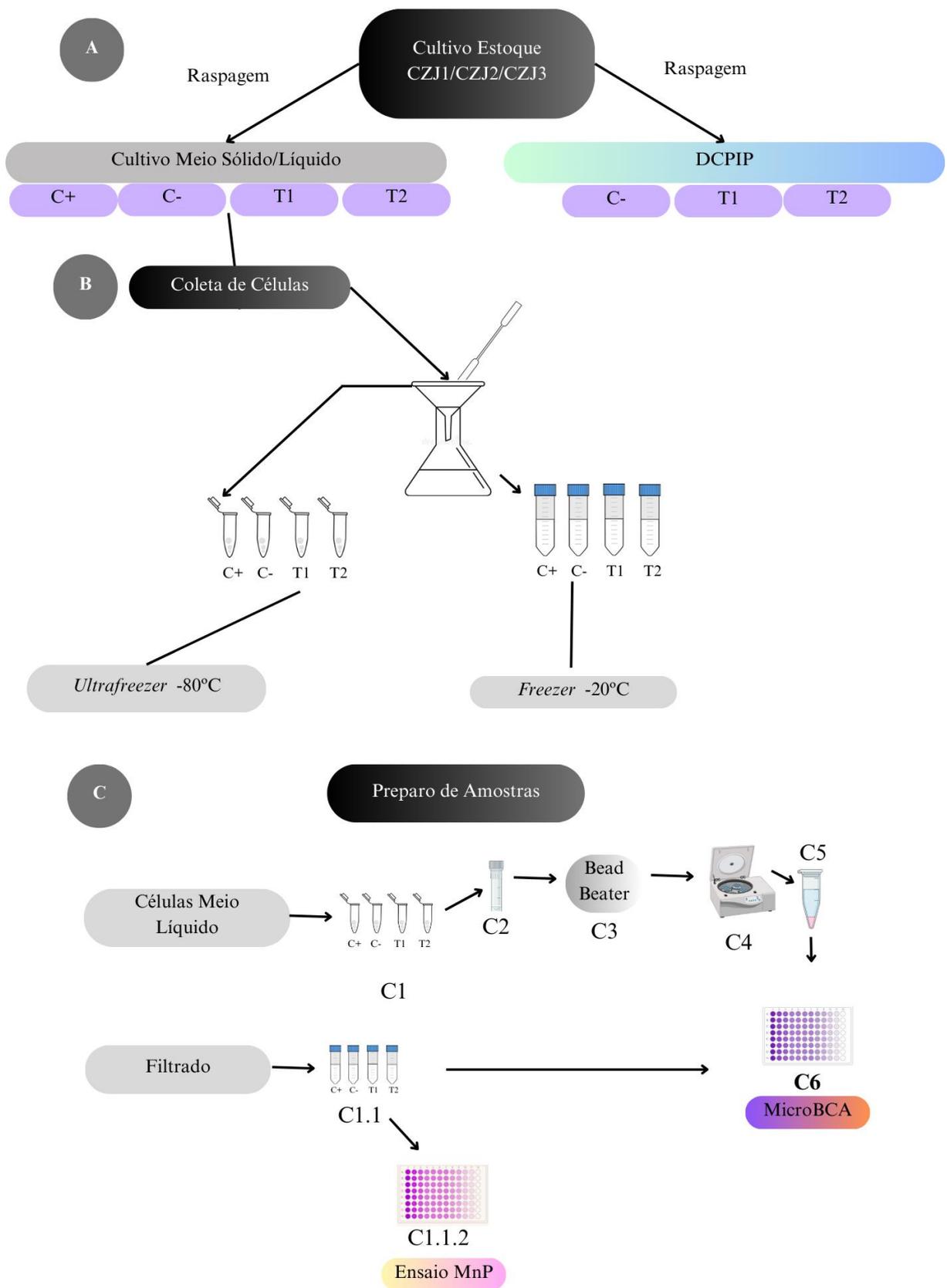
4: C4), coletando-se o sobrenadante (Figura 4: C5). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

1.3.2 Quantificação de Proteínas

Realizou-se a quantificação de proteínas intracelulares (*P. formosus* (CZJ1) e secretômicas cultivadas em meio líquido e dos respectivos secretomas. Prosseguiu-se com a quantificação por meio do kit *Micro BCA™ Protein Assay Kit- Thermo Fisher*®, levando em conta que o ácido bicinconínico (BCA) é considerado mais sensível na detecção de proteínas.

A quantificação foi realizada em placa com 96 micropoços, as amostras dos grupos (C+, C-, T1 e T2) foram diluídas em proporções 1:200, 1:100, 1:50, 1:10, juntamente com as amostras de Albumina Sérica Bovina (BSA) para realização da curva padrão, nos seguintes padrões: 40µg/ml, 20 µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml e 2,5µg/ml. Feito isso, utilizou-se espectrofotômetro leitor de placas CLARIOstar® Plus (BMG Labtech) a uma leitura de 562 nanômetros (nm) para verificar a concentração de proteínas (Figura 4: C6). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Figura 4: Fluxograma Metodológico. **A) Cultivo Estoque, Grupos e DCPIP:** A partir da raspagem do cultivo estoque para liberação dos esporos fúngicos, realizou-se o cultivo dos grupos controle positivo (C+), controle negativo (C-), teste com óleo diesel (T1) e petróleo (T2) dos meios sólido e líquido e para os testes com DCPIP. **B) Coleta de Células:** A coleta em meio sólido foi realizada por meio de espátula de aço, coletando-se todos os micélios escolhido no quadrante escolhido, acondicionando-os em microtubos de 2,0 ml e inserindo sob congelamento a -80°C. Coletou-se as células fúngicas cultivadas em meio líquido que ficaram retidas na superfície do filtro, resguardando-as em -80°C, assim como, coletou-se 25 ml do filtrado de cada um dos respectivos grupos, conservando-as a -20°C. **C) Preparo de amostras:** Verificou-se a concentração de proteínas por meio de kit BCA, de proteínas intracelulares (*P. formosus*) e do secretoma.



2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO

2.1.1 Coloração e Morfologia de *Paecilomyces formosus* (CZJ1)

No meio sólido, o fungo *Paecilomyces formosus* (CZJ1) apresenta no cultivo estoque, coloração marrom e bege (Figura 5: Estoque CZJ1). Após a sua raspagem, aparenta cores fortemente marrom e branca em controle positivo (Figura 5: C+), similar ao cultivo estoque.

Os grupos controle negativo (Figura 5: C-), óleo diesel a 1% (Figura 5: T1) e petróleo a 1% (Figura 5: T2), aparentam o predomínio de micélios brancos. Observa-se a abrangência do crescimento micelial no diâmetro das placas de Petri (Figura 5). Em cultivo estoque, repara-se um crescimento extenso dos micélios com aspecto aveludado, dos quais, estendem-se até as bordas com leves elevações ao centro (figura 5: Estoque CZJ1).

Percebe-se, no controle positivo (Figura 5: C+), a formação micelial preenchendo bem a área da placa de Petri. Na mesa de luz do mesmo controle, nota-se a evidência dessa grande massa de micélios cobrindo todo o perímetro (Figura 5: c+), ambas apresentando aspecto algodonosos. Tal morfologia, assemelha-se ao cultivo contendo petróleo, do qual, expôs crescimento robusto, assim como, a mesma textura algodonosa por toda a placa (Figura 5: T2), em mesa de luz, apresenta-se ao redor do petróleo manchas mais claras, indicando o crescimento dos corpos de frutificação, apontado pelas setas verdes (Figura 5: t2). No cultivo com óleo diesel a 1%, houve crescimento das colônias no canto inferior, de aparência granulosa e aveludada, revelando extensão das hifas em direção as bordas das placas, pode-se ser observada essa extensão na mesa de luz e fora dela (Figura 5: T1 e t1).

O fungo *P. formosus* (CZJ1) demonstra eficácia no crescimento com petróleo e óleo diesel na concentração de 1%, verifica-se a diferença desse crescimento quando comparado ao crescimento em controle negativo (Figura 5: C-; c-). Repara-se nas imagens em mesa de luz (Figura 5: c-) e fora dela (Figura 5: C-), que há pouco crescimento dos micélios de *P. formosus*, demonstrando-se pequeno e disperso na placa, indicando que somente o meio mínimo não é suficiente para compor o desenvolvimento desse fungo, necessitando-se das fontes de carbono e energia, supridas pelo óleo diesel e petróleo a 1%. O respectivo fungo cresce vultuoso na presença dessas substâncias, demonstrando o potencial de *P. formosus* (CZJ1) para crescimento em substâncias petrolíferas, caracterizando-o como um ótimo candidato para degradação de petróleo e seus hidrocarbonetos.

Kumar et al., (2023) elucidada que quando há meios contendo fontes de carbonos tradicionais, como por exemplo, dextrose, o crescimento dos filamentos do gênero

Paecilomyces apresentam na parte superior da placa, cores em tons de marrom, castanho a castanho-escuro no centro e levemente esbranquiçado nas regiões periféricas com aparência aveludada, com crescimento ótimo em um período de 7 dias, entre 25 a 28°C. Os resultados de Kumar et al., (2023) corroboram com os apresentados neste trabalho, elucidado pela figura 5, uma vez que *P. formosus* (CZJ1) exibe características de cor marrom e brancas e aparência aveludada, assim como confirmado pelos autores. Os bolores desse gênero, caracterizam-se pela superfície de forma aveludada, assim como mostram os resultados em controle positivo (Figura 5: C+), óleo diesel (Figura 5: T1) e petróleo (Figura 5: T2) em um período de 7 dias.

Os mesmos autores, afirmam que a espécie *Paecilomyces variotii* cresceu de forma suntuosa em meio *Bushnell-Haas* sólido, do qual não existia fonte de carbono, sendo este, enriquecido com 2% de óleo diesel. Martin-Sanchez; Gorbushina e Toepel, (2018) relataram a presença de contaminação por *P. variotii* em tanques de combustíveis, especialmente em misturas contendo diesel e biodiesel, declarando que estes fungos possuem resistência para substâncias tóxicas. Percebe-se que *P. formosus* (CZJ1), também foi capaz de crescer em óleo diesel na concentração de 1%, no mesmo período de 7 dias, ressaltando a importância do gênero *Paecilomyces* para a degradação de combustíveis e biocombustíveis. A literatura científica carece de pesquisas acerca do crescimento de *P. formosus* em petróleo, necessitando-se de mais estudos nessa área.

A tabela 2, elucida a coloração e morfologia do fungo *P. formosus* (CZJ1) durante o seu crescimento em meio sólido nos respectivos grupos.

Figura 5: Crescimento de *Paecilomyces formosus* (CZJ1) em controle positivo contendo MYG e ágar (C+); controle negativo contendo somente meio mínimo e ágar (C-), teste com óleo diesel a 1%+ meio mínimo+ágar (T1) e teste com petróleo a 1%+ meio mínimo+ ágar (T2). Todos os grupos foram padronizados com crescimento durante 7 dias em câmara de germinação. **C+**, **C-**, **T1** e **T2**: Fotografias do crescimento fúngico fora da mesa de luz. **c+**, **c-**, **t1** e **t2**: Fotografias do crescimento fúngico em mesa de luz. Em teste com petróleo verificado em mesa de luz (t2) demonstra-se o crescimento dos corpos de frutificação ao redor do petróleo, indicado pelas setas verdes. **Concentração de esporos:** $6,64 \times 10^7$ esporos/mL. Nota-se um vasto crescimento nos testes

com óleo diesel e petróleo quando comparados ao controle negativo, indicando que a presença dessas substâncias é utilizada pelo fungo como fonte de carbono.

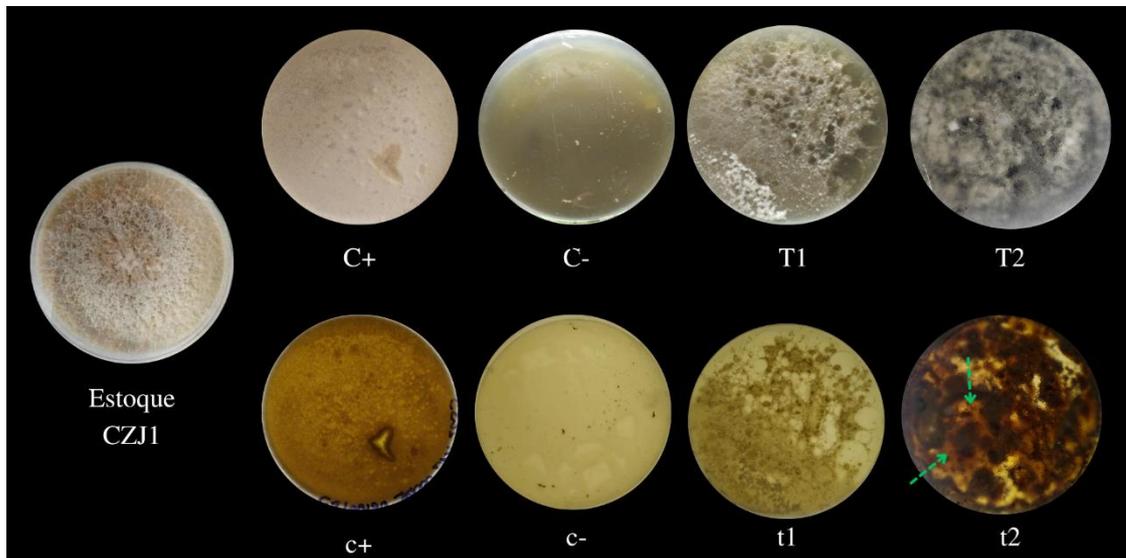


Tabela 2: Coloração e Morfologia de *P. formosus* (CZJ1) em meio sólido.

Grupos	Cor	Morfologia
Cultivo Estoque	Marron e Bege	Boa extensão dos micélios (até as bordas), aveludado, leves elevações ao centro.
Controle positivo (C+); (c+)	Marron e Branca	Preenchimento da massa micelial por todo o perímetro, algodonoso.
Controle negativo (C-); (c-)	Micélios Brancos	Pouco crescimento dos micélios, dispersos na placa.
Teste óleo diesel (T1); (t1)	Micélios Brancos	Crescimento granuloso das colônias, revelando extensão dos micélios.
Teste petróleo (T2);(t2)	Micélios Brancos	Crescimento robusto por toda a placa e algodonoso. Corpos de frutificação (setas verdes)

2.1.2 Coloração e Morfologia de *Clonostachys byssicola* (CZJ2)

O fungo *Clonostachys byssicola* (CZJ2) aparenta tonalidade branca e tons de laranja ao centro, no cultivo estoque (Figura 6: Estoque CZJ2). Realizou-se a raspagem do fungo em questão para prosseguimento do cultivo dos grupos. Em controle positivo, (Figura 6: C+) é notável a presença de micélios brancos e alaranjados. Em controle negativo (Figura 6: C-), óleo

diesel (Figura 6: T1) e petróleo (Figura 6: T2) o fungo exibe coloração predominantemente branca.

No cultivo estoque, *C. byssicola* (CZJ2) apresenta morfologia com prolongamento de micélios aveludados, semelhantes a textura algodosa, e bordas filiformes (Figura 6: estoque CZJ2). O controle positivo demonstra micélios alongados e colônias centrais por todo o perímetro da placa de Petri, observado nas figuras com e sem mesa de luz (Figura 6: C+; c+).

O teste do qual foi cultivado óleo diesel 1%, apresenta formações granuladas por quase todo o perímetro plaquel, das quais as colônias apresentam aspecto bem granuloso e bordas levemente irregulares (Figura 6: T1 e t2). O cultivo com inserção de petróleo, demonstrou aspecto semelhante ao óleo diesel, porém, as colônias fúngicas cresceram com menos intensidade, entretanto, pode-se perceber as mesmas por toda a superfície do petróleo, em formas similares a pequenos grânulos (Figura 6: T2 e t2). Os cultivos com óleo diesel e petróleo, expuseram resultados satisfatórios, constatando o crescimento proveitoso em comparação ao controle negativo, do qual, exibiu crescimento singelo das hifas somente com a presença de elementos de meio mínimo (Figura 6: C-; c-).

O fungo *C. byssicola* (CZJ2) revelou-se muito promissor no cultivo em petróleo e principalmente, na presença de óleo diesel, evidenciando que estes químicos proporcionaram melhor progressão do crescimento fúngico. Ressalta-se, a inexistência de literaturas e registros de *C. byssicola* no crescimento com petróleo e óleo diesel ou em outro tipo de petroderivado, apontando esses resultados como inéditos em trabalhos dos quais envolvem a biorremediação.

Kapeua-Ndacnou et al., (2023) afirmam que o gênero *Clonostachys* quando cultivado em meio sólido, ou seja, na presença de ágar, pode apresentar colônias planas ou mais elevadas, contendo bordas onduladas. Sendo assim, os micélios podem expor aparência algodosa ou felpuda, denso ou possuindo partes granuladas, de cores brancas a rosadas e massa de esporos esbranquiçadas, aparentando esporulação abundante após 10 dias de crescimento, usualmente revelando 46 mm de diâmetro em meios incluindo batata.

A coloração e morfologia dos grupos (Figura 6: C+, C-, T1 e T2), também apresentam aparência felpuda e massa de esporos de coloração branca. Salientando-se, o cultivo com petróleo (Figura 6: T2; t2) e especialmente, com óleo diesel (Figura 6: T1;t1) que demonstraram colônias granuladas e totalmente esbranquiçadas. Aparentemente, constata-se esporulação desse fungo nas fontes de carbono citadas, assim como afirma Kapeua-Ndacnou et al (2023). Além disso, Schroers et al., (1999) ressaltam que colônias de *Clonostachys* podem apresentar características granulosa em meio BDA, devido à grande aglomeração dos esporos.

Evidencia-se a presença de colônias granuladas não somente em cultivo contendo meio BDA, mas na presença de óleo diesel (Figura 6: T1 e t1), assim como, petróleo (Figura 6: T2 e t2), revelando que o fungo conseguiu crescer, mesmo sem a presença de batata e dextrose. Observa-se na tabela 3, a descrição da coloração e morfologia de *C. byssicola* (CZJ2) quando cultivado nos controles e testes. Vale ressaltar que ainda não existem registros fotográficos de *C. byssicola* (CZJ2) relatado por outros autores. Sendo assim, os registros morfológicos e de coloração do respectivo fungo são exclusividade deste trabalho.

Figura 6: Crescimento de *Clonostachys byssicola* (CZJ2) em controle positivo em meio BDA (C+); controle negativo contendo somente meio mínimo e ágar (C-), teste com óleo diesel a 1%+ meio mínimo+ágar (T1) e teste com petróleo a 1%+ meio mínimo+ ágar (T2). Todos os grupos foram padronizados com crescimento durante 7 dias em T°C ambiente. **C+, C-, T1 e T2:** Fotografias do crescimento fúngico fora da mesa de luz. **c+, c-, t1 e t2:** Fotografias do crescimento fúngico em mesa de luz. **Concentração de esporos:** $1,6 \times 10^7$ esporos/ml. Percebe-se grande extensão da massa micelial principalmente em óleo diesel, assemelhando-se ao tamanho da massa de micélios do controle positivo, revelando que as substâncias petrolíferas utilizadas se tornam essenciais para o crescimento fúngico. Ademais, nota-se que o controle negativo desse mesmo fungo, exibiu pouco crescimento somente na presença de meio mínimo.

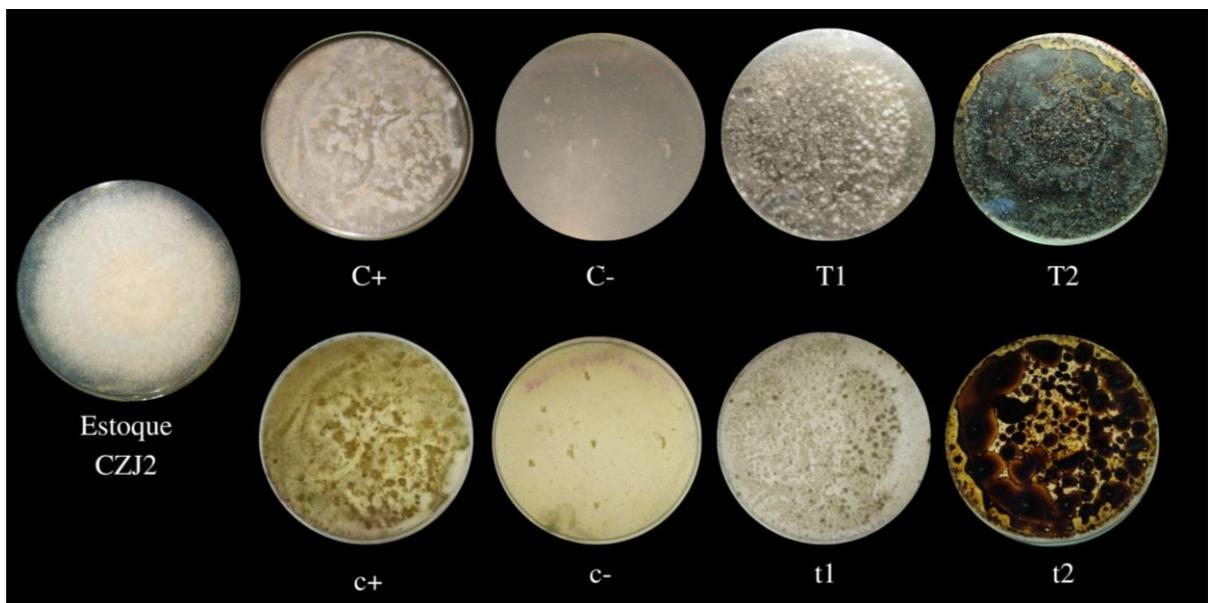


Tabela 3: Coloração e Morfologia de *C. byssicola* (CZJ2) em meio sólido.

Grupos	Cor	Morfologia
Cultivo Estoque	Tonalidade branca e tons de laranja ao centro	Prolongamento de micélios aveludados, algodinoso e bordas filiformes
Controle positivo (C+); (c+)	Micélios brancos e alaranjados	Micélios alongados com colônias centrais por toda a placa
Controle negativo (C-); (c-)	Colônias totalmente brancas	Pouco crescimento dos micélios
Teste óleo diesel (T1); (t1)	Colônias totalmente brancas	Colônias bem granulosa e bordas irregulares
teste petróleo (T2);(t2)	Colônias totalmente brancas	Colônias granulosa menos intensas

2.1.3 Coloração e Morfologia de *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3)

Em se tratando do crescimento em meio contendo ágar, *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3) apresenta pigmentação preta em cultivo estoque (Figura 7: Estoque CZJ3). No controle positivo expõe coloração predominantemente preta com leves tons castanho-escuros (Figura 7: C+). Em controle negativo (Figura 7: C-) exibe pequenos micélios de cor branca, quanto ao teste com óleo diesel (Figura 7: T1), revela-se coloração preta e em petróleo (Figura 7: T2) manifesta-se crescimento do fungo em cor castanha, bege ao centro e bordas esbranquiçadas.

O cultivo estoque (Figura 7: Estoque CZJ3) e o controle positivo (Figura 7: C+; c-) apresentam morfologia da colônia parecido a um formato coriáceo, disperso integralmente pela circunferência da placa, sem a presença de bordas. Na presença de óleo diesel a 1% (Figura 7:T1), a colônia revela-se totalmente desenvolvida na superfície da placa. Em mesa de luz do mesmo teste, avista-se o prolongamento dos micélios cobrindo a área da placa de Petri. (Figura 7:t1). No teste envolvendo petróleo a 1%, o fungo cresce em formato de manchas extensas e aveludadas, aparentando bordas irregulares (Figura 7: T1), ressalta-se ao redor das manchas de petróleo, a sombra da massa micelial, apontada pela seta verde (Figura 7: t2). O controle negativo (Figura 7: C-), demonstra em mesa de luz (Figura 7: c-), crescimento de pequenas formações dos corpos de frutificação abrangendo a totalidade da placa sem a presença de bordas.

O fungo *A. brasiliensis* (CZJ3) demonstrou grande potencial quanto ao crescimento com óleo diesel e petróleo. Comparado ao crescimento em controle negativo, que demonstrou menos progresso de crescimento em meio sólido, acompanhando sem nenhuma fonte de carbono. Comprova-se que este fungo exibe potencialidade para usar poluentes como fonte de

carbono e energia no desenvolvimento do seu crescimento. Além disso, este hifomiceto é exclusivamente encontrando em solo do Cerrado e arredores do Distrito Federal, sendo o primeiro fungo dessa região a ser utilizado em testes com petróleo e óleo diesel.

Saleem e Ali, (2017) afirmam que as espécies de *Aspergillus*, sobretudo *A. niger* têm crescimento de micélios muito extensos quando há adição de variadas fontes de Carbono, Nitrogênio ou minerais. As colônias podem chegar até 90mm de diâmetro nas placas de Petri, garantindo um ótimo desenvolvimento desse gênero. Repara-se o crescimento de *A. brasiliensis* (CZJ3) em todos os grupos (Figura 7: C+, C-, T1 e T2). No caso de controle positivo (Figura 7: C+), consta-se com a fonte de carbono dextrose, tratando-se do controle negativo (Figura 7: C-), complementado com minerais.

Nos testes (Figura 7: T1 e T2), existe a adição de meio mínimo e as possíveis fontes de carbonos, das quais são, óleo diesel e petróleo na concentração de 1%. Observa-se a extensão micelial deste fungo nas placas de petri, principalmente em controle positivo e nos testes, abrangendo boa parte da superfície da placa, devido a adição de fontes de carbonos e minerais, assim como ressaltados pelos autores citados, Saleem e Ali, (2017).

Cultivos de *A. brasiliensis* em óleo diesel e petróleo, ainda não foram descritos em bibliografias científicas, fazendo com que os resultados apresentados nesta pesquisa sejam pioneiros a reportar esse fungo nos cultivos em petróleo e óleo diesel. A tabela 4 expõe a coloração e morfologia de *A. brasiliensis* (CZJ3) no cultivo com petróleo (T1), diesel (T2), meio sem fonte de carbono (C-) e com dextrose (C+) em meio sólido.

Figura 7: Crescimento de *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3) em controle positivo contendo meio (PDA) (C+); controle negativo contendo somente meio mínimo e ágar (C-), teste com óleo diesel a 1%+ meio mínimo+ágar (T1) e teste com petróleo a 1%+ meio mínimo+ ágar (T2). Todos os grupos foram padronizados com crescimento durante 7 dias em BOD. **C+, C-, T1 e T2:**Fotografias do crescimento fúngico fora da mesa de luz. **c+, c-, t1 e t2:** Fotografias do crescimento fúngico em mesa de luz. Evidencia-se o sombreamento da massa de micélios ao redor das manchas de petróleos em teste com petróleo na visualização da mesa de luz, apontadas pelas setas verdes. **Concentração de esporos:** $3,5 \times 10^7$ esporos/mL. Identifica-se crescimento da massa micelial no cultivo com petróleo a 1%, abrangendo bem o centro da placa. Além do mais, o cultivo suplementado com óleo diesel, demonstrou ótimo crescimento da biomassa de *A. brasiliensis*, similar ao controle positivo (C+), exibindo

crescimento muito superior em comparação ao controle negativo (C-), apontando que este fungo exprime potencial para degradação de petroderivados.

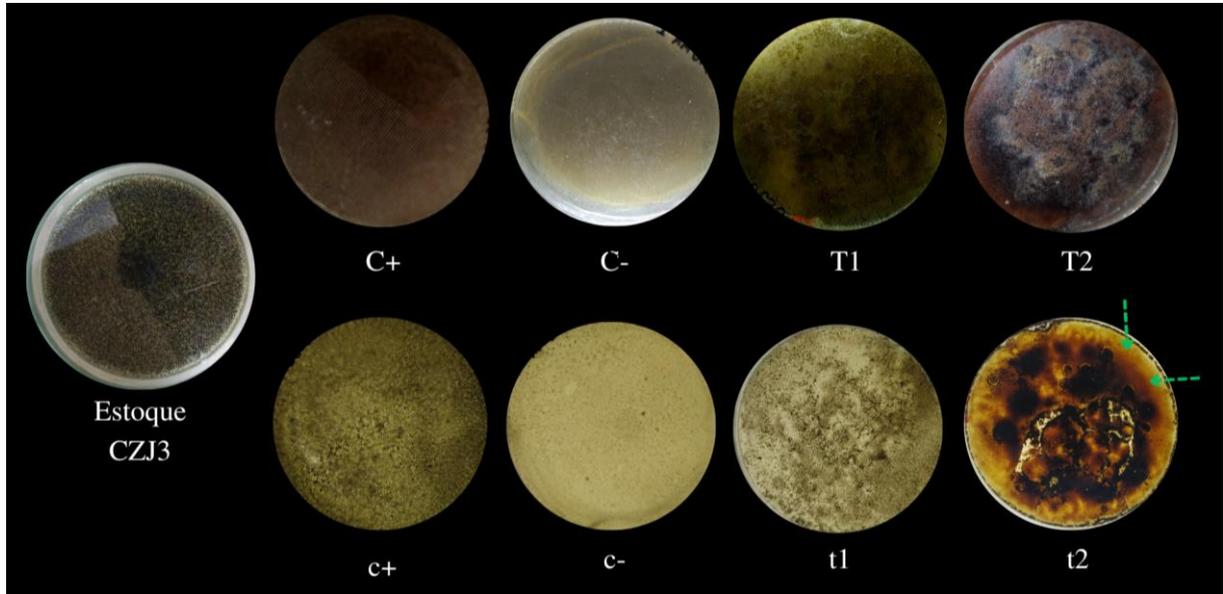


Tabela 4: Coloração e Morfologia de *A. brasiliensis* (CZJ3) em meio sólido.

Grupos	Cor	Morfologia
Cultivo Estoque	Pigmentação preta	Colônia similar a aspecto coriáceo, disperso integralmente na placa e sem bordas
Controle positivo (C+); (c+)	Preta com leves tons castanho-escuros	Colônia similar a aspecto coriáceo, disperso integralmente na placa e sem bordas
Controle negativo (C-); (c-)	Micélios de cor branca	Formações de pequenos corpos de frutificações dispersos por toda a placa.
Teste óleo diesel (T1); (t1)	Preta	Prolongamento dos micélios por toda a placa de petri.
Teste petróleo (T2);(t2)	Cor castanha, bege ao centro e bordas esbranquiçadas.	Mancha extensa e aveludadas. Sem a presença de bordas, massa micelial elucidada pelas setas verdes.

2.2 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO

2.2.1 Coloração e Morfologia de *Paecilomyces formosus* (CZJ1)

No meio líquido, o fungo *P. formosus* (CZJ1) demonstra no controle positivo (Figura 8: CZJ1/C+), do qual contém meio MYG, coloração em tons de marrom e castanho. O controle negativo, dotado de meio mínimo (Figura 8: CZJ1/C-) e o teste com óleo diesel (Figura 8: CZJ1/T1), exibem micélios de cor acastanhada. Por outro lado, o cultivo contendo petróleo apresenta tonalidade bastante esbranquiçada aderida a superfície do petróleo, indicado pela seta verde (Figura 8: CZJ1/T2).

Em cultivos sem a presença de ágar, o controle positivo de *P. formosus* (CZJ1) aparenta micélios em formatos grandes e ovais (Figura 8: CZJ1/C+). O controle negativo do mesmo fungo (Figura 8: CZJ1/C-) demonstra pequenas micéios de formatos irregulares espalhadas ao meio líquido. Em contrapartida, o teste envolvendo óleo diesel demonstra micélios com prolongamentos enovelados e bem alongados. Algumas apresentam-se em formato de “véu”, verificado pela seta vermelha (Figura 8: CZJ1/T1). O meio líquido com inserção de petróleo, fez com que o fungo criasse uma espécie de corpo de micélios envolvendo essa substância, evidenciado pela seta laranja (Figura 8: CZJ1/T2) e aderido à superfície, ressaltado pela seta verde, realizando-se uma possível adsorção, da qual poderá ser observada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 8: CZJ1/T2).

Percebe-se que houve crescimento de *P. formosus* (CZJ1) nos testes com óleo diesel (Figura 8: CZJ1/T1) e especialmente petróleo (Figura 8: CZJ1/T2) uma vez que, quando comparado ao controle negativo (Figura 8: CZJ1/C-), é notório que este fungo se beneficiou das fontes de carbono presentes nestas substâncias, uma vez que os micélios verificam-se bem mais desenvolvidas comparadas ao cultivo somente com meio mínimo (Figura 8: CZJ1/C-). A tabela 5, elucida a morfologia e coloração do respectivo fungo nos grupos citados em meio líquido.

Nos experimentos de Li et al., (2017), relatam a capacidade de *P. formosus* realizar adsorção por metais através de seus micélios. Existem três possibilidades para a adsorção ocorrer, através de precipitação extracelular, troca iônica e adsorção hidrolítica, sendo estes os mecanismos biológicos que mais contribuem para a sobrevivência dos fungos em meios dotados de toxicidade (FOMINA; GADD, 2014). Observa-se o mesmo fenômeno relatado pelos autores citados na figura 8 (CZJ1/PT), no qual, o desenvolvimento de *P. formosus* (CZJ1) pode

ser visualizada aderido ao petróleo. Em estudo de Bilal et al., (2017), salientam a habilidade de *P. formosus* na sorção de metal Ni quando integrado as plantas de soja.

Além disto, o crescimento em óleo diesel do respectivo fungo é ressaltado pelo estudo de Gassen et al., (2015), no qual afirma que o gênero *Paecilomyces* desenvolve-se bem na presença dos ésteres contidos no próprio combustível citado. Percebe-se o crescimento de *P. formosus* (CZJ1) em óleo diesel a 1%, validando que o mesmo pode-se aproveitar do óleo diesel e suas propriedades químicas, corroborando com o estudo de Gassen et al., (2015).

Os estudos carecem de relatos acerca do crescimento e desenvolvimento de *P. formosus* (CZJ1) em petróleo e óleo diesel na região centro-oeste brasileira, possivelmente sendo relatado pela primeira vez neste trabalho.

Figura 8: Cultivo de *P. formosus* (CZJ1) em meio líquido. Ressalta-se que o fungo apresentado os demonstra resistência contra petróleo e derivados, uma vez que todas houve crescimento nas substâncias citadas. *P. formosus* (CZJ1) em teste com óleo diesel (CZJ1/T2) apresenta micélios em formato de “véu”, verificado pela seta vermelha, por outro lado, o teste com petróleo demonstra corpo de micélios notado pela seta laranja (CZJ1/T2) aderido à superfície, ressaltado pela seta verde, realizando-se possível fenômeno da adsorção. **Concentração de esporos:** *P. formosus* (CZJ1): $1,14 \times 10^7$ esporos/mL;

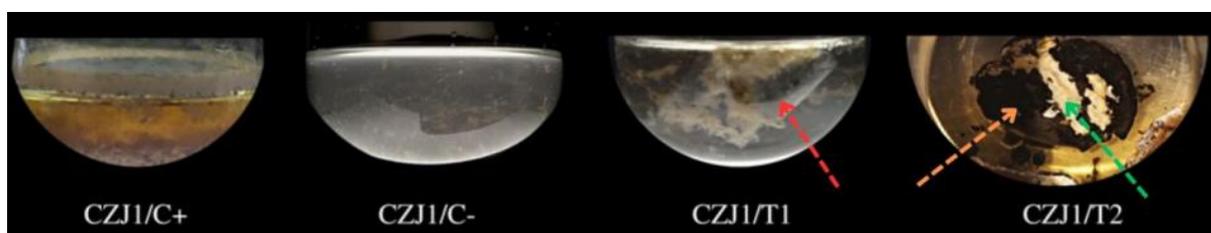


Tabela 5: Coloração e morfologia de *P. formosus* (CZJ1) em meio líquido.

Grupos	Cor	Morfologia
Controle positivo (CZJ1/C+)	Tons de marrom e castanho	Apresenta micélios em formatos grandes e ovais
Controle negativo (CZJ1/C-)	Micélios de cor acastanhada	Micélios de formatos irregulares dispersas no meio líquido
Teste óleo diesel (CZJ1/T1)	Micélios de cor acastanhada	Micélios com prolongamentos enovelados e alongados, em formato de véu (seta vermelha)
Teste petróleo (CZJ1/T2)	Tonalidade esbranquiçada aderido na superfície do petróleo (seta verde)	Corpo de micélios envolvendo o petróleo (seta laranja). ADSORÇÃO (seta verde)

2.2.2 Coloração e Morfologia *Clonostachys byssicola* (CZJ2)

O controle positivo do respectivo fungo, apresenta micélios prolongados, de cor amarela, branca e tons de laranja, caracterizando a coloração desse fungo na presença de meio BDA (Figura 9: CZJ2/C+). De acordo com Schroers (2000), na natureza, *Clonostachys* geralmente ostentam coloração em tons de laranja, marrom e branco, assemelhando-se as cores quando cultivadas em meio BDA (Figura 9: CZJ2/C+). O controle negativo (Figura 9:CZJ2/C-) e o teste com óleo diesel (Figura 9:CZJ2/T1) apresentam micélios de coloração alva, assim como no teste em petróleo (Figura 9:CZJ2/T2), confirmando com estudo de Schroers (2000).

O aspecto morfológico em controle positivo BDA (Figura 9: CZJ2/C+), apresenta-se com grande extensão dos micélios aveludados, preenchendo totalmente o fundo do *Erlenmeyer* (Figura 9: CZJ2/C+). O controle negativo (Figura 9:CZJ2/C-), apresenta os micélios em forma de elipses pequenas com bordas regulares lisas, espalhados ao meio mínimo.

O mesmo fungo crescendo em óleo diesel (Figura 9: CZJ2/T1) aparentou competente desenvolvimento. Percebe-se micélios pequenos, semelhantes aos apresentados ao controle negativo com meio mínimo, porém, é notável o crescimento de micélios prolongadas entrançadas formando um “S”, como aponta a seta rosa, expondo textura felpuda desses micélios. No cultivo com petróleo (Figura 9: CZJ2/T2), *C. byssicola* (CZJ2) aparenta um crescimento de pequenos micélios, algodonosos e de bordas bastante irregulares, depositadas ao fundo do *Erlenmeyer*. Certifica-se na tabela 6, a coloração e morofologia de *C. byssicola* (CZJ2) aparentada no cultivo em meio líquido nos controles e testes.

Schroers (2001) elucida que na fase assexuada, *Clonostachys* revela massa conidial de cor branca. Repara-se a cor branca em controle negativo (CZJ2/C-), óleo diesel (CZJ2/T1) e petróleo (CZJ2/T2), presumindo que *C. byssicola* na presença de meio mínimo e hidrocarbonetos reproduziu-se assexuadamente.

Presencia-se um bom crescimento deste fungo, sobretudo, em óleo diesel (CZJ2/T1), do qual identifica-se positivo equiparado ao controle negativo (Figura 9: CZJ2/C-) que expressou um desenvolvimento mais simples desse fungo, comprovando que os petroderivados intensificam o aumento dos propágulos fúngicos de *C. byssicola* (CZJ2). Ainda não existem registros de documentos científicos dos quais mencionam cultivo de *C. byssicola* em petróleo e óleo diesel cultivados em meio líquido, portanto, fazendo destes registros restritos ao presente trabalho.

Figura 9: Crescimento no meio líquido de *C. byssicola* (CZJ2) em controle positivo (C+); controle negativo(C-), óleo diesel a 1% (T1) petróleo a 1% (T2). *C. byssicola* (CZJ2) quando cultivado na presença de óleo

diesel, revela massa de micélios entrelaçada em formato de “S” (CZJ2/T1). **Concentração de esporos:** $5,36 \times 10^7$ esporos/mL

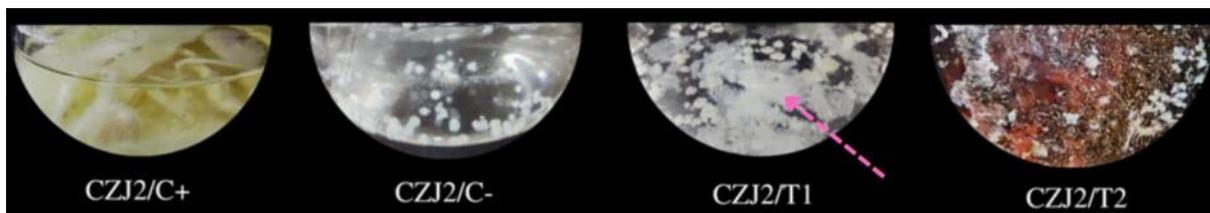


Tabela 6: Coloração e morfologia de *C. byssicola* (CZJ2) em meio líquido.

Grupos	Cor	Morfologia
Controle positivo (CZJ2/C+)	Micélios amarelos, brancos e tons de laranja	Grande extensão dos micélios e aveludados
Controle negativo (CZJ2/C-)	Micélios de coloração alva	Elipses pequenas, bordas regulares lisas, espalhados ao meio mínimo.
Teste óleo diesel (CZJ2/T1)	Micélios de coloração alva	Micélios pequenos, assim como, prolongados entrançadas formando um “S” (seta rosa) e textura felpuda.
Teste petróleo (CZJ2/T2)	Micélios de coloração alva	Pequenos micélios algodonosos, de bordas irregulares

2.2.3 Coloração e Morfologia de *Aspergillus brasiliensis* (CZJ3)

Em meio sem ágar, *A. brasiliensis* (CZJ3) exibe coloração da massa micelial preta e em tons de branco em meio PDA (Figura 10: CZJ3/C+). Na presença de meio mínimo, os micélios apresentam cor totalmente preta, caracterizando a tonalidade revelada em controle negativo (Figura 10: CZJ3/C-). O meio de cultura contendo óleo diesel e meio mínimo exibe micélios pretos com o meio em tom amarelado, por causa da presença do óleo citado (Figura 10: CZJ3/T1). O cultivo com petróleo apresenta micélios de cor predominantemente preta (Figura 10: CZJ3/T2).

Em controle positivo (Figura 10: CZJ3/C+) o fungo tratado evidencia um conjunto de micélios de formas ovais, grandes e circunferência das bordas bem delineadas. No controle negativo (Figura 10: CZJ3/C-) presencia-se bastante aglomeração de micélios, sendo estes de tamanhos medianos, evidenciado pela seta lilás. De outro modo, o cultivo em petróleo (Figura 10: CZJ3/T2), repara-se um agrupamento dos micélios similar ao controle negativo, de tamanhos pequenos, entretanto, estes estão distanciados uns dos outros, apontados pelas setas azuis-claros. Nota-se o crescimento de *A. brasiliensis* (CZJ3) em petróleo, levando-se em conta

a toxicidade desta substância, destacando-se a aptidão do fungo para crescimento em meio de cultura contendo hidrocarbonetos.

O cultivo com diesel (Figura 10: CZJ3/T1), expõe alguns micélios enovelados de tamanhos pequenos, exposto pelas setas azuis-escuros, assim como, demonstra micélios alongados, apontadas pelas setas amarelas (Figura 10: CZJ3/T1) evidenciando que óleo diesel favorece o desenvolvimento do respectivo fungo, bem melhor do que em meio sem fonte de carbono, neste caso, meio mínimo, exposto pelo controle negativo (Figura 810 CZJ3/C-). Observa-se a coloração e morfologia de *A. brasiliensis* (CZJ3) pela tabela 7.

Até o presente momento, não se encontram referências acerca de *A. brasiliensis* (CZJ3) cultivado nesse tipo de substâncias, evidenciado o relato deste fungo em petróleo e óleo diesel originais do presente estudo.

Figura 10: Cultivo de *A. brasiliensis* (CZJ3) em meio líquido. O fungo em meio mínimo manifesta bastante aglomeração dos micélios, apontado pelas setas lilás (CZJ3/C-), no cultivo com petróleo (CZJ3/T2) nota-se agrupamento dos micélios similar ao controle negativo, de tamanhos pequenos, entretanto, mais dispersos uns dos outros, apontados pelas setas azuis-claros. Entretanto, em cultivo com óleo diesel (CZJ3/T1), apresenta-se micélios enovelados e pequenas, assinalado pelas setas azuis-escuros, assim como, demonstra micélios alongados, apontadas pelas setas amarelas. **Concentração de esporos:** $9,1 \times 10^7$ esporos/mL.

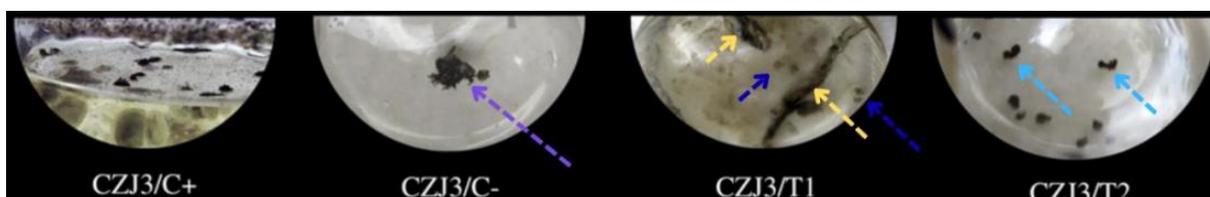


Tabela 7: Coloração e morfologia de *A. brasiliensis* (CZJ3) em meio líquido.

Grupos	Cor	Morfologia
Controle positivo (CZJ3/C+)	Micélios pretos e tons de branco	Micélios de formas ovais, grandes, circunferências bem delineadas
Controle negativo (CZJ3/C-)	Totalmente preta	Aglomeração dos micélios (setas lilás)
Teste óleo diesel (CZJ3/T1)	Totalmente preta	Micélios enovelados pequenos (setas azuis-escuro) alongadas (setas amarelas)
Teste petróleo (CZJ3/T2)	Totalmente preta	Agrupamento dos micélios mais distantes (setas azuis-clara)

2.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.3.1 Quantificação de Proteínas Intracelulares

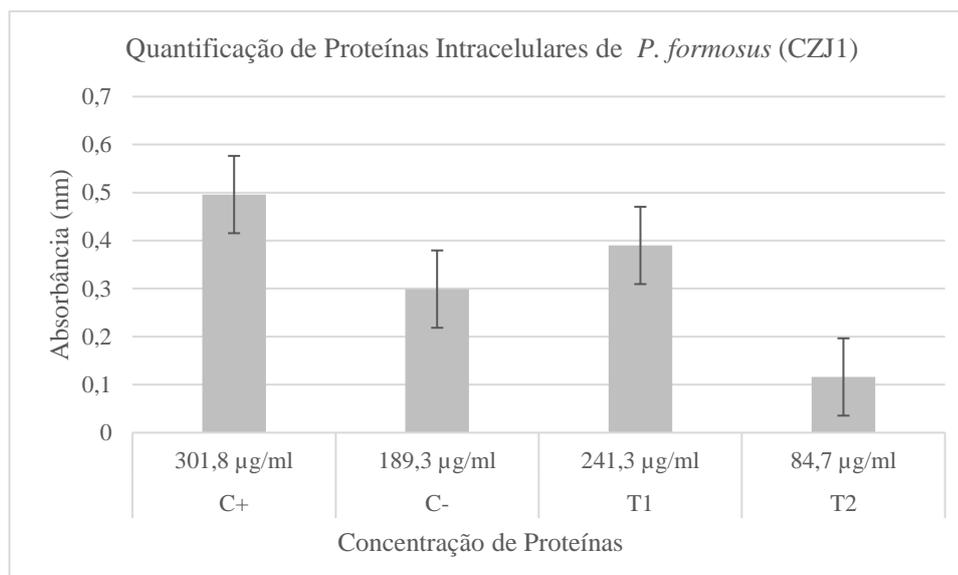
Em razão do bom crescimento em petróleo de *P. formosus* (CZJ1) optou-se por realizar a quantificação de proteínas das células coletadas na superfície do papel de filtro qualitativo, ou seja, cultivadas em meio líquido, com objetivo de verificar o quanto este microrganismo está utilizando do seu maquinário secretório.

Construiu-se o gráfico (figura 11), para melhor visualização da quantidade a ser apresentada de proteínas intracelulares. Optou-se por construir os resultados a partir da diluição 1:10, da qual exibiu melhores resultados de proteínas dentre os grupos controle positivo (C+), controle negativo (C-), óleo diesel (T1) e petróleo (T2). Validando a eficiência da lise celular realizada e da sensibilidade do BCA em detectar proteínas. Obteve-se o valor real da proteína multiplicando-se pelo fator da diluição (x10).

Nota-se que *P. formosus* (CZJ1) manifesta proteínas em todos os grupos (C+, C-, T1 e T2), confirmando que a liberação delas está presente quando o fungo cresce em meio contendo dextrose (301,8 µg/ml), meio mínimo (189,3 µg/ml) e especialmente óleo diesel (241,3 µg/ml) e petróleo (84,7 µg/ml). A concentração proteica em controle positivo (C+) demonstrou-se elevada, seguindo-se pelo teste em óleo diesel (T1), controle negativo (C-) e petróleo (T2).

Repara-se que a concentração de proteínas em óleo diesel (T1) revelou-se maior, comparada ao controle negativo (C-). Todavia, o teste com petróleo (T2) também manifestou proteínas. Os resultados demonstram que a excreção de proteínas intracelulares exerce papel fundamental, colaborando para o crescimento fúngico, evidenciado a aptidão e resiliência deste microrganismo em crescer em substância tóxicas e com a presença de hidrocarbonetos.

Figura 11: Quantificação de proteínas de *P. formosus* (CZJ1). Revela-se concentrações de proteínas secretadas intracelularmente nos respectivos grupos, controle positivo (C+), controle negativo (C-), óleo diesel (T1) e petróleo (T2) em diferentes níveis de absorvância realizada pelo método BCA. Nota-se que a presença de proteínas em óleo diesel e petróleo conseguiu ser manifestada, levando-se em consideração a toxicidade destes compostos, evidenciando o potencial do microrganismo citado. Embora a menor produção de proteína seja do teste com petróleo (T2), ainda assim, presencia-se bons dados da secreção proteica deste fungo. Considera-se a possibilidade do mesmo, estar focado na fonte de carbono, neste caso, o petróleo, liberando menos enzimas do que o necessário para promover seu próprio crescimento na substância citada.



Kumar et al., (2023b) estudaram a degradação de hidrocarbonetos dada pelos fungos *Paecilomyces variotti* e *Penicillium citrinum*. Um dos padrões que usaram para análise foi a densidade óptica (DO), com o auxílio de um espectrofotômetro. Objetivaram avaliar a DO de cada isolado fúngico, em cultura líquida com fermentação, durante 15 dias de tratamento, medindo-se a DO a cada três dias, em comprimento de onda a 620 nm. Os resultados demonstraram alteração na DO de *P. variotti* (0.783 DO) três vezes maior do que em *P. citrinum* (0.241 DO) durante o mesmo período de incubação. Os autores salientam que alterações na DO, pode ser atribuída ao crescimento fúngico em substratos contendo hidrocarbonetos, liberando enzimas, assim como, ácidos, na tentativa de reduzir os hidrocarbonetos a metabólitos mais simples. A partir disso, os fungos podem obter nutrientes para o seu próprio desenvolvimento.

Ferdinand et al., (2020) explica que variações na DO em espectrofotômetro, indicam a utilização de hidrocarbonetos como substratos para o crescimento de fungos. No presente estudo, percebe-se na, figura 11, que *P. formosus* (CZJ1) apresenta diferenças na DO nos diferentes grupos, controle positivo (0,496 nm), controle negativo (0,299 nm), testes com óleo diesel (0,39 nm) e teste com petróleo (0,116 nm).

Em controle positivo, a absorbância revela-se maior. Em óleo diesel, da qual a absorbância demonstrou-se maior comparado ao controle negativo, evidenciado que *P. formosus* (CZJ1) aproveitou-se do óleo diesel como fonte de carbono. A colorimetria promovida pelo BCA, evidenciou concentração proteica mesmo em cultivo com petróleo, conseguindo demonstrar resultados de proteínas deste fungo, evidenciado a sensibilidade e apuração do ácido na detecção das concentrações de proteínas.

Os resultados presentes neste estudo complementam-se com os apontados por Kumar et al., (2023b) e Ferdinand et al., (2020) pois as variações de absorvância, possivelmente demonstram que *P. formosus* (CZJ1) pode estar degradando hidrocarbonetos, liberando ácidos ou enzimas, e no caso presente, as proteínas, uma vez que se constata a concentração de proteínas no cultivo de todos os grupos (figura 11).

Vale ressaltar que ainda é inexistente a quantificação de proteínas de *P. formosus* (CZJ1) em trabalhos com petróleo e óleo diesel. Nesse ponto futura espectrometria de massas poderá revelar importantes informações a respeito da identificação de compostos desconhecidos, assim como, quantificação de compostos conhecidos e auxílio no entendimento estrutural de diversas moléculas, especialmente as proteínas.

2.3.2 Quantificação de proteínas do *Secretoma*

A tabela 8 revela a quantificação de proteínas secretadas pelos respectivos fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) em meios de cultivo dotados de dextrose (C+), somente meio mínimo (C-), óleo diesel (teste 1) e petróleo (teste 2), os dois últimos, na concentração de 1%.

O fungo *P. formosus* (CZJ1) apresenta quantidade elevada de proteínas no cultivo em meio MYG, dado pelo controle positivo (C+), no qual apontou 3.152 µg/mL. O cultivo no meio mínimo, caracterizando o controle negativo (C-), expôs o menor valor, dentre os três fungos trabalhados, de 56,09 µg/mL. Por outro lado, em diesel (teste 1) e petróleo (teste 2), revelou-se os valores de 23,14 µg/mL e 62,9 µg/mL. Este último, revela a maior concentração de proteínas secretadas em petróleo comparado a *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), visto na tabela 8.

Velmurugan et al., (2017) expressam em sua pesquisa, na qual a cepa de *Paecilomyces sp.* SF-8 demonstrou tolerância ao cloreto de sódio (NaCl), resistindo até 8% de NaCl, classificando-o como uma espécie halofílica moderada, confirmando-se a potencialidade dessa espécie e seu uso em áreas poluídas por hidrocarbonetos. Os pesquisadores Hernández-Rodríguez, Hastings e Momany, (2012) e Sathishkumar et al., (2014) explanam que condições estressantes, por exemplo, alta salinidade, podem não prejudicar diretamente os fungos filamentosos, entretanto, são capazes de reduzir a sua taxa de crescimento.

Considerando-se a vigente dissertação, *P. formosus* (CZJ1), obteve êxito ao crescer em petróleo e diesel na concentração de 1%, assim como, manifestar proteínas nos referidos testes. Ressalta-se a capacidade deste fungo em utilizar as fontes de carbono formada por

hidrocarbonetos, especialmente em petróleo, do qual representou a maior concentração proteica (62,9 µg/mL). À vista disso, os resultados obtidos com *P. formosus* (CZJ1), revalida os estudos de Velmurugan et al., (2017), em consequência da possibilidade da espécie *P. formosus* (CZJ1) ser resistente a alguns sais presente no petróleo, levando em conta sua origem marítima. Além disso, superestima os resultados de Hernández-Rodríguez, Hastings e Momany, (2012) e Sathishkumar et al., (2014) (VOLKE-SEPULVEDA et al., 2016) considerando-se a falta de redução na taxa de crescimento de *P. formosus* (CZJ1), observando-se sua adsorção na referida substância química, ressaltado pela figura 8. Os resultados apontados pelos estudos dos autores referenciado, conjuntamente com os apresentados na atual pesquisa, reforçam o potencial de *P. formosus* (CZJ1) a ser utilizado em áreas poluídas com hidrocarbonetos.

O fungo *A. brasiliensis* (CZJ3) foi o microrganismo do qual expressou maior quantidade de proteínas no controle positivo (C+), totalizada em 8.297 µg/mL. Em controle negativo (C-), apresentou-se 70,11 µg/mL, no teste 1, determinado como cultivo em óleo diesel, expressou a maior concentração proteica perante *P. formosus* (CZJ1) e *C. byssicola* (CZJ2), resultando em 183,61 µg/mL. Nos testes com petróleo (teste 2), apontou valor de 51,70 µg/mL, próximo ao valor apontado de *P. formosus* (CZJ1), apenas com uma diferença de 11,7 µg/mL de proteínas dentre os dois fungos, relacionado nos cultivos em petróleo a 1%.

Volke-Sepulveda et al., (2016) elucidam que aumentos gradativos nas concentrações de glicose proporcionam acréscimos na secreção de proteínas, desse modo, favorecem o catabolismo. Além disso Lu et al., (2010), estabelece informação, na qual, o fungo *A. niger*, em ocasiões nas quais é inserido em fonte de carbono, exibe efeitos maiores no secretoma, comparado ao proteoma intracelular. Percebe-se no presente estudo, no qual, *A. brasiliensis* (CZJ3) exibiu quantidades elevadas de proteínas (8.297 µg/mL) para o controle positivo (C+), corroborando com as afirmações de Lu et al., (2010) e Volke-Sepulveda et al., (2016) no qual a fonte de carbono (dextrose 4%) inserido no respectivo controle, permitiu condições favoráveis para *A. brasiliensis* (CZJ3) secretar mais de 8.000 µg/mL de proteínas.

Ademais, no trabalho de Salgado-Bautista et al., (2020), alegam que a fermentação em estado sólido (SSF) de *A. brasiliensis* demonstrou concentrações superiores e diversas de proteínas secretadas. Este tipo de fermentação aumenta o metabolismo oxidativo e o nível de ramificação de suas hifas, além de favorecer a secreção de proteínas das quais possuem ação na adesão fúngica ao substrato (SALGADO-BAUTISTA et al., 2020). O fungo *A. brasiliensis* (CZJ3) do presente estudo não passou por testes de fermentação sólida em nenhum dos cultivos, especialmente em petróleo e diesel, comprovando-se qualificação do referido fungo a ser

utilizados em trabalhos biorremediativos, em razão da manifestação de proteínas em ambos os testes, sem o auxílio de qualquer tipo de fermentação.

O fungo *C. byssicola*, quando cultivado em meio BDA demonstrou valor de 1.820 µg/mL, dado pelo controle positivo (C+), seguindo-se pelo controle negativo (C-), apontou o maior valor nessa categoria, resultando em 158,42 µg/mL, nos testes com diesel (teste 1) revelou 55,05 µg/mL e quando cultivado em petróleo (teste 2) demonstrou 38,76 µg/mL. Os resultados apontam *C. byssicola* (CZJ2) como um fungo resistente, em razão da maior concentração proteica (158,42 µg/mL), em meio no qual não há nenhuma fonte de carbono, somente elementos do meio mínimo. Todavia, o mesmo fungo produziu e manifestou proteínas secretadas, em diesel e petróleo, revelando a capacidade deste fungo em desenvolver-se na presença de hidrocarbonetos, especialmente em óleo diesel, do qual foi o segundo melhor fungo a manifestar proteínas neste tipo de teste (55,05 µg/mL), como observado na tabela 8. Destaca-se a escassez de resultados a respeito do gênero *Clonstachys*, necessitando-se de mais estudos na relação entre proteínas secretadas e degradação aos petroderivados.

Chen, Wang e Hu, (2010) reportam que vários grupos químicos como hidroxilas, carbonilas, carboxilas, aminas e ligações fosfodiéster, contribuem para a ligação dos HPAs à superfície da biomassa dos fungos. Porém, o completo perfil proteico de fungos filamentosos ainda não foi totalmente caracterizado quando estão cultivados com diferentes HPAs (CHEN, WANG e HU, 2010). O futuro uso das tecnologias proteômicas poderá fornecer novos esclarecimentos acerca do conhecimento metabólico destes microrganismos na tolerância e sobrevivência em ambientes dotados de hidrocarbonetos.

Fragner et al., (2009) explica que fungos cultivados em laboratório, geralmente secretam proteínas em baixas concentrações, entre 5 a 50 µg/mL. Percebe-se que os fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) manifestam a quantidade estabelecida por Fragner et al., (2009). Contudo, no caso de *P. formosus* (CZJ1) em cultivo com petróleo e nos casos de *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) nos testes com óleo cultivo, superestimam as concentrações de 5 a 50 µg/mL propostas por Fragner et al., (2009)

Tabela 8: Quantificação de proteínas dos secretomas dos fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3). Os valores do controle positivo (C+) estão estabelecidos na diluição 1:100, enquanto controle negativo (C-) e os testes encontram-se na diluição 1:10. Todos os três fungos expressam quantidades elevadas de proteínas nos controles positivos (C+), uma vez que estes possuem dextrose atuando como fonte de carbono. Entretanto, a tríade destes fungos filamentosos, apresentam secreção de proteína em controle negativo (C-), comprovando-se resistência destes fungos em crescer em meio sem fontes de carbono, destacando-se *C. byssicola* (CZJ2). Nos testes com óleo diesel (teste1), sobressaiu-se *A. brasiliensis* (CZJ3) e petróleo (teste

2), notabilizando-se *P. formosus* (CZJ1). Além disso, *C. byssicola* (CZJ2) expôs concentração de proteínas em ambos os testes.

Fungos	Controle Positivo (C+)	Controle Negativo (C-)	Teste 1 (diesel)	Teste 2 (petróleo)
<i>P. formosus</i> (CZJ1)	3.152	56,09	23,14	62,9
<i>C. byssicola</i> (CZJ2)	1.820	158,42	55,05	38,76
<i>A. brasiliensis</i> (CZJ3)	8.297	70,11	183,61	51,70

2.4) ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANGANÊS-PEROXIDASE (MnP):

Os três fungos, *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) demonstram atividade da enzima MnP, atuando em diferentes fontes de carbono. O fungo *P. formosus* (CZJ1), manifestou 8,21 U/mL em controle positivo (C+), e em cultivo com petróleo expressou 8,93 U/mL. *C. byssicola* (CZJ2) manifestou 29,93 U/mL quando inoculado em diesel e *A. brasiliensis* (CZJ3) registrou 15,24 U/mL quando desafiado com petróleo, assim como observado na figura 12.

Em trabalho de Ameen et al., (2016) relataram que *P. variotii* apresentou 3,97 U/mL em cultivo com diesel, tendo em vista que esta substância têm menos toxicidade comparada ao petróleo. A atual dissertação, demonstra a aptidão de *P. formosus* (CZJ1), para biodegradar hidrocarbonetos a partir da liberação da enzima MnP (8,93 U/mL) em petroderivados. No estudo de Maciel et al., (2011), o gênero *Paecilomyces sp.* apontou 51 U/mL da atividade da referente enzima em cultivo com inserção de diesel. Ressalta-se, que a atividade enzimática de MnP do fungo *P. formosus* (CZJ1), apontou valores similares quando foi cultivado em petróleo, tal qual, no meio MYG, dotado da fonte de carbono dextrose, revelando o potencial do fungo em desenvolver-se em meio com hidrocarbonetos possivelmente tóxicos, comprovando-se a sua adaptação a fonte de carbono (hidrocarbonetos) garantindo o uso deste microrganismos e de suas enzimas em processos biorremediativos.

Procedendo-se no estudo de Ameen et al., (2016), os autores apontam que *Aspergillus terreus* apresentou 4,08 U/mL de MnP cultivado em diesel. A pesquisa revelou expressão MnP

de *A. tamarii* em 7,0 U/mL, assim como, o gênero *Aspergillus spp.* demonstraram 15 U/mL com óleo diesel atuando como substrato. No presente trabalho, *A. brasiliensis* (CZJ3) certificou atividade de MnP superior em cultivo com petróleo (15,24 U/mL) comparado aos trabalhos de Ameen et al., (2016) e Maciel et al., (2011), dos quais indicam resultados somente com óleo diesel. Os dados corroboram com estudo de Reis et al., (2019), nos quais afirmam que espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. niger*, são citados como ótimos fungos para a produção de variadas enzimas, incluído lacases e MnP. No trabalho de Cortés-Espinosa et al., (2011) realizaram expressão heteróloga de MnP através do gene (*mnp1*) em cepa modificada de *A. niger* (SCB2-T3) e visualizaram os efeitos da atividade de MnP para auxiliar na degradação de fenantreno no solo, utilizando-se meio complementado com maltose. Os resultados assinalam que a referida enzima atingiu 16,0 U/mL em um período de aproximadamente 40 horas. Por outro lado, *A. brasiliensis* (CZJ3) apontou resultado quase igualado (15,24 U/mL) sem nenhum tipo de expressão heteróloga para auxílio no crescimento em petróleo, indicando a potencialidade deste fungo para ser usado em derrames de petróleo e similares.

Na tese de Cruz, (2017), testou-se o co-ocultivo de três fungos, sendo eles: *A. niger*, *Cunninghamella elegans* e *Rhizopus arrhizus*, cultivados sob biorreator com diesel a 10% e avaliou-se atividade enzimática de MnP. Percebe-se que no 15º dia, o último dia de cultivo, o consórcio destes fungos atingiu 29,34 U/mL, do qual teve melhor liberação de MnP nos 11º e 12º dias, totalizando igualmente 50,13 U/mL da mesma. No presente estudo, *C. byssicola* (CZJ2) atingiu em cultivo isolado, valor superior (29,93 U/mL) com apenas 7 dias de cultivo no óleo diesel a 1%, estimando os resultados do consórcio de Cruz, (2017) com 15 dias, demonstrando eficiência deste fungo micoparasita para degradação de óleo diesel e semelhantes.

Substâncias ricas em HPAs, tais como, diesel, petróleo e derivados possuem maior concentração de compostos alifáticos, induzindo a liberação extracelular das enzimas MnP, lacases e lignina-peroxidases (QAYYUM; MAROOF; YASHA,2009) razão pela qual os fungos *P. formosus* (CZJ1), *A. brasiliensis* (CZJ3) e *C. byssicola* (CZJ2) deste trabalho, certificam atividade extracelular da enzima MnP. Mancera-López et al., (2008) atestam que a aclimação em óleos refinados pode ser um fator importante na liberação de enzimas oxidativas em petroderivados. À vista disso, permite uma pré-adaptação, providenciando alto estímulo fúngico, induzindo-os a liberem quantidades elevadas de enzimas oxidativas devido a estimulação na produção de metabólitos a partir de enzimas lignolíticas, utilizando os substratos encontrados no meio, neste caso, petróleo e diesel. Além disso, Feng et al., (2007), ressalta que

os hidrocarbonetos presentes em petroderivados exerce influência na produção de enzimas, melhorando a sua síntese, para aplicações em processos de biorremediação.

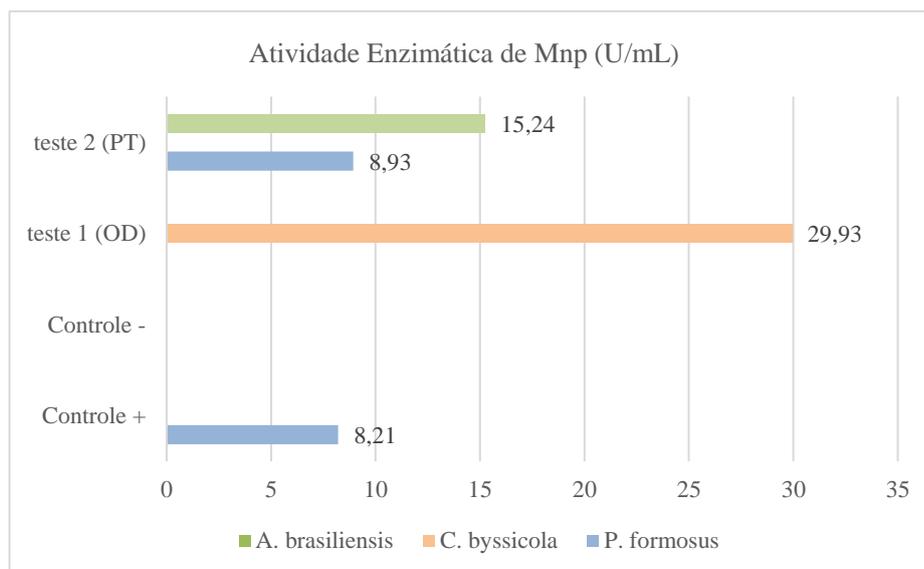
Dantas et al., (2021) testemunham que as enzimas oxidativas necessitam de alguns indutores, pois resultam em melhor atividade das mesmas, principalmente quando encontram-se em meios complexos (FARIA, 2010). Algumas das condições ideais, conferem o cultivo com no mínimo 15 dias a 30°C, pequenas quantidades de tween 80% (0.01%) (DANTAS et al., 2021) e no caso de MnP, faixa de pH entre 4.5 e 5.0 (ZHANG et al., 2016). Além do mais, consórcio entre os fungos, configura-se como alternativa benéfica para a descoberta de novos compostos e enzimas (DANTAS et al., 2021)

Os trabalhos citados demonstram a capacidade de vários fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Paecilomyces* em liberarem MnP para degradação dos hidrocarbonetos. Assim como, na presente dissertação, apresentam-se três espécies diferentes de fungos do bioma Cerrado, manifestando atividade de MnP em diesel e petróleo, corroborando com os autores e seus respectivos resultados referenciados acima.

Ressalta-se que a atividade enzimática da presente dissertação, dos fungos supraditos, foi avaliada somente das amostras secretômicas (filtrado), das quais não houve nenhum processo de ultrafiltração, purificação e nem expressão heteróloga, revelando a potencialidade destes fungos em consumir petróleo e óleo diesel, permitindo no futuro, o desenvolvimento de produtos biotecnológicos a partir de suas enzimas.

Vale evidenciar a falta de dados na literatura científica a respeito de *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), demonstrando atividade de MnP em petroderivados, tornando os resultados da atual dissertação, singulares para tais fungos.

Figura 12: Atividade Enzimática de MnP (U/mL). Os fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) revelaram a atividade da enzima extracelular manganês-peroxidase (Mnp) em diversos grupos. O primeiro, apresenta taxas semelhantes quando comparado ao cultivo com petróleo e controle positivo, demonstrando sua afinidade em desenvolver-se em petróleo. Por outro lado, o segundo, demonstra boa atividade da referida enzima, sendo o único a manifestá-la no cultivo com óleo diesel. O último, demonstra potencial para crescimento em petróleo, tendo em vista que exprimiu atividade mais alta de MnP no referido cultivo.



2.5) BIODEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POR DCPIP:

Os ensaios com o indicador DCPIP demonstram descoloração da cor azul nos diferentes fungos. Nota-se falta de descoloração para os controles negativos (C-), uma vez que estes não possuem hidrocarbonetos (Figura 13: C-). Por outro lado, os ensaios com diesel (Figura 13:T1) revelaram descoloração total do corante, indicando ótima biodegradação deste óleo, para todas as espécies de fungos, *P. formosus* (CZJ1) *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3). De outro modo, nos casos de *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3), apresentaram-se clareamento da cor azul, evidenciando a degradação dos hidrocarbonetos presentes no petróleo (Figura 13: T2), comprovando-se pela figura 13. Entretanto, *C. byssicola* (CZJ2) não revelou muita descoloração da cor azul em petróleo a 1%, comparado ao controle negativo (C-), evidenciado na figura 13.

Silva et al., (2022b) utilizaram DCPIP com o gênero *Aspergillus spp.* previamente aclimatados em óleo de motor queimado, objetivando verificar a descoloração do corante quando o referido gênero foi inserido em querosene e diesel. Após 72 horas, o fungo degradou 100% dos respectivos óleos, dada pela descoloração total do DCPIP. De acordo com Ozyurek et al., (2021), consideram o gênero *Aspergillus* um dos mais eficientes a respeito de degradação em hidrocarbonetos. O mencionado gênero encontra-se amplamente distribuído no ambiente, devido a grande produção e resistência de seus esporos, oportunizando a sobrevivência do gênero em ambientes estressantes com altas temperaturas, baixa umidade e elevadas concentrações de petróleo bruto, garantindo vantagem para sobreviver nestes tipos de *habitats*

(AL-DOSSARY et al., 2020; SCHWARZ et al., 2019). As afirmações dos autores, contribuem para a validação de *A. brasiliensis* (CZJ3) desta dissertação, salienta-se que o uso desta espécie pode ser muito benéfico em diesel, sobretudo, em trabalhos com petróleo, garantindo bons resultados de degradação dessas substâncias verificados pela figura 13, com o teste DCPIP.

Em trabalho de El-hanafy et al., (2015) relatam que *A. niger* conferiu 54% de degradação de hidrocarbonetos em 15 dias a 30°C em cultura agitada. Dessa forma, puderam atestar estes resultados com a descoloração de DCPIP, sendo assim, os pesquisadores elucidam que *Aspergillus sp.* verifica-se como microrganismos promissores para descontaminar regiões ecossistêmicas atingidas com derrames de petróleo e derivados EL-Hanafy et al., (2015). Em trabalho de Nasrawi (2012) testaram *A. niger* na remoção de massa de petróleo bruto de derramentos no golfo do México, acompanhando os resultados paralelamente com DCPIP. O referente fungo acarretou a maior perda de massa petrolífera, totalizando 8,6%. Portanto, os autores puderam comprovar de forma qualitativa a degradação de hidrocarbonetos do petróleo cru por meio DCPIP, do qual visualizaram o inóculo de *A.niger* quase totalmente transparente no cultivo com petróleo bruto (NASRAWI, 2012).

Observa-se que *A. brasiliensis* (CZJ3) degradou o óleo diesel, bem como, expôs descoloração parcial de DCPIP no cultivo a 1% de petróleo (figura 13). Denota-se degradação efetiva, através de processos oxidativos, dos hidrocarbonetos presentes, correlacionado-se com os estudos de Nasrawi (2012) e El-hanafy et al., (2015), levando em conta que *A. niger* e *A. brasiliensis* (CZJ3) compartilham de filogenias muito próximas (VESTH et al., 2018). Estes dois fungos podem fornecer resultados semelhantes quando trabalhados em biorremediação.

Além disso, os três fungos da presente pesquisa foram cultivados sob agitação a 150 rpm. Conforme Durval (2017), culturas agitadas transferem melhor a massa de O₂ em trabalhos dos quais envolvem biodegradação, por este motivo, os fungos dessa dissertação, exibiram resultados satisfatórios nas condições de cultivo estabelecidas juntamente com o DCPIP.

Em estudo de Lima et al., (2017), isolaram fungos de derramamentos de dois tipos de óleos advindos de sedimentos da bacia do recôncavo baiano, com diferentes frações dos respectivos óleos, composto por hidrocarbonetos aromáticos, saturados e compostos sem hidrocarbonetos (NSO). Sendo assim, os autores utilizaram DCPIP, garantindo resultados dos quais contribuíram na seleção dos fungos com os maiores potenciais de degradação das frações dos óleos citados. O trabalho de Lima et al., (2017) e colaboradores corrobora em confirmar que cultivos com DCPIP trata-se de uma ótima técnica colorimétrica na verificação de oxidação, conseqüentemente, na degradação de petróleo e derivados. Posto isto, esse estudo reforça que os fungos do presente trabalho *P. formosus* (CZJ1) *C. byssicola* (CZJ2) e *A.*

brasiliensis (CZJ3), oxidam os hidrocarbonetos presente no diesel e petróleo, assegurando a validade do método DCPIP.

Lemos et al., (2002) consente que os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium* são ótimos fungos para degradar hidrocarbonetos. Sendo assim, o presente trabalho, comprova a afirmação de Lemos et al., (2002), uma vez que se contata degradação de hidrocarbonetos pela oxidação do corante DCPIP para *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3), visto pela figura 13, indicando que os dois fungos estão habilitados para trabalhos dos quais envolvem degradação de hidrocarbonetos presentes em petroderivados.

Estendendo-se em estudo de Lima et al., (2017), elucidam que a adaptação em óleos refinados, constitui-se como fator crucial para aumentar a capacidade de degradação fúngica, técnica normalmente usada em ambientes petrolíferos. Percebe-se que no presente trabalho, *P. formosus* (CZJ1) *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), não necessitaram de aclimatação ou adaptação em óleos de composições mais leves. Assegura-se a capacidade destes fungos encontrados em solo do Cerrado em biodegradar os hidrocarbonetos presentes no diesel e petróleo a 1%, como observado pela técnica de DCPIP (figura 13).

Conduzindo-se nos resultados de Lima et al., (2017) elucidam que concentração de esporos é fator independente da capacidade oxidativa de cada fungo. Em seus próprios resultados, observaram oxidação 100% de algumas cepas dos compostos oleosos com concentração de 10^5 esporos/mL. Vale ressaltar que foram inoculados 10^7 esporos/mL, para os fungos *P. formosus* (CZJ1) *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), do qual contribuíram na degradação total do DCPIP em óleo diesel para os três fungos referidos e degradação parcial para *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3), ilustrado na figura 13. O trabalho de Lima et al., (2017) não abordou resultados com petróleo, por outro lado, a vigente pesquisa, demonstrou concentração de 10^7 esporos/mL para *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), verificando-se apropriada para degradar petróleo e derivados.

Leahy e Colwell (1990b) declaram que o uso de engenharia genética para resultar na obtenção de novas atividades metabólicas, por exemplo, a inserção de plasmídeos de adaptação aos hidrocarbonetos é um fator do qual melhora expressivamente os resultados. Comprova-se que os fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), demonstram capacidade de adaptação à fonte de carbono, neste caso, os hidrocarbonetos presentes em petróleo e diesel, tendo em vista que não foi utilizado nenhum processo de engenharia genética na estimulação, demonstrando excelente predisposição destes fungos filamentosos a serem trabalhos em derramamentos de petróleo e derivados.

Destaca-se carência de literatura a respeito das espécies *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) em resultados utilizando-se DCPIP. As produções da atual dissertação relacionado os fungos supracitados são especialmente deste trabalho.

Figura 13: Ensaio colorimétrico de DCPIP em tubos de ensaio. Nota-se descoloração total do indicador DCPIP no teste com óleo diesel (T1) dos três fungos *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3), indicando degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo. De outro modo, *P. formosus* (CZJ1) e *A. brasiliensis* (CZJ3) revelam degradação parcial nos ensaios com petróleo (T2), apontado pelo próprio corante. Sendo assim, ressalta-se a aptidão dos fungos à fonte de carbono (hidrocarbonetos) dotadas no petróleo (T2) e diesel (T1).



CONCLUSÃO

Nota-se que o petróleo e óleo diesel ainda estão fortemente presentes no cotidiano da sociedade, especialmente no processo de combustíveis. Porém, esses químicos acarretam problemas na saúde ambiental e humana, tendo em vista que essas substâncias são potencialmente carcinogênicas e mutagênicas, além de difícil remoção nos ambientes.

O presente trabalho buscou implementar o uso de microrganismos para avaliar o crescimento deles em cultivos contendo óleo diesel e petróleo, destacando-se os fungos encontrados no bioma Cerrado. Evidenciou-se o crescimento, morfologia e coloração de três espécies de fungos, sendo elas, *P. formosus* (CZJ1), *C. byssicola* (CZJ2) e *A. brasiliensis* (CZJ3) cultivados em petróleo e óleo diesel a 1%, tendo em vista que quando cultivados somente com meio mínimo, sem adição de fonte de carbono, todos os fungos apresentaram menor crescimento de seus micélios. Ademais, ressalta-se a manifestação de proteínas exibidas pelo fungo *P. formosus* (CZJ1) quando cultivado em meio líquido, revelando a capacidade destes em utilizarem hidrocarbonetos presentes nas substâncias citadas como fonte de carbono e metabolizá-las para o benefício do seu ciclo de vida. Além do mais, presenciou-se concentração de proteínas secretadas para todos os três fungos. Os testes enzimáticos para MnP foram bem estabelecidos, evidenciando que os fungos utilizam as enzimas oxidativas para degradar os hidrocarbonetos presentes no substrato, posto isso, pode-se comprovar a degradação de hidrocarbonetos pela descoloração de DCPIP.

Com o auxílio de novas tecnologias, incluindo estudos proteômicos iniciais e espectrometria de massas proteômica, possibilitará a otimização das enzimas extracelulares, compostos bioativos e moléculas orgânicas das quais poderão ser utilizadas à uma escala maiores agregadas a biorrefinarias, auxiliando na construção de um sistema biológico de bioremediação viável, ecológico e capaz de atenuar os riscos de derrames de petróleo e hidrocarbonetos.

PERSPECTIVAS

- Cultivar em petróleo e óleo diesel novas espécies de fungos, sendo elas, *Penicillium cerradense*, *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus tamaritii*;
- Avaliar a aderência do fungo *P. formosus* (CZJ1) em microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Prosseguir com as metodologias proteômicas;
- Fazer o teste de tolerância aos hidrocarbonetos;
- Promover estresse oxidativos para os fungos liberarem mais proteínas, consequentemente, enzimas extracelulares para a produção de produtos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

ABATENH, E. et al. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. **Open J Environ Biol**, v. 2, n. 1, p. 38–046, 2017.

AL-DOSSARY, M. et al. Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. **Remediation Journal**, v. 30, p. 1–9, mar. 2020.

AL-HAWASH, A. B. Fungal Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 2, p. 8–24, 28 mar. 2018.

AMEEN, F. et al. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 211–218, 1 mar. 2016.

ANDRADE, M. C. **Produção e otimização de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em diferentes resíduos de café**. Brasília: Universidade de Brasília-UnB, nov. 2020.

ATAKPA, E. O. et al. Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 290, 1 mar. 2022.

BANITZ, T. et al. Highways versus pipelines: Contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 2, p. 211–218, abr. 2013.

BECARELLI, S. et al. Hydrocarbonoclastic Ascomycetes to enhance co-composting of total petroleum hydrocarbon (TPH) contaminated dredged sediments and lignocellulosic matrices. **New Biotechnology**, v. 50, p. 27–36, 25 maio 2019.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. **Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil** **International Biodeterioration & Biodegradation**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ibiod>.

BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C. E. **Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*** **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [s.l: s.n.].

BILAL, S. et al. Endophytic *paecilomyces formosus* LHL10 Augments glycine max L. Adaptation to ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 29 maio 2017.

BISWAS, J. K.; BANERJEE, A.; BISWAS, S. Chapter 22 - Microbes and marine oil spills: oil-eating bugs can cure oily sea sickness. Em: DAS, P.; MANNA, S.; PANDEY, J. K. (Eds.). **Advances in Oil-Water Separation**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 393–422.

BLAJBERG SCHAFFEL, S. et al. **A QUESTÃO AMBIENTAL NA ETAPA DE PERFURAÇÃO DE POÇOS MARÍTIMOS DE ÓLEO E GÁS NO BRASIL**. [s.l.: s.n.].

BORCHERT, E. et al. **Enhancing Microbial Pollutant Degradation by Integrating Eco-Evolutionary Principles with Environmental Biotechnology**. **Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 out. 2021.

BUCKINGHAM-HOWES, S. et al. Prolonged Financial Distress After the Deepwater Horizon Oil Spill Predicts Behavioral Health. **Journal of Behavioral Health Services and Research**, v. 46, n. 2, p. 294–305, 15 abr. 2019.

CASTRO E SILVA, A. et al. Biodegradação de Derivados de Petróleo (HPAs) por fungo *Trametes cubensis*. **Revista de Biotecnologia & Ciência**., v. 8, n. 2, 27 fev. 2019.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. Em: **Fungi in Bioremediation**. [s.l.] Cambridge University Press, 2009. p. 136–187.

CHEN, B.; WANG, Y.; HU, D. Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1–3, p. 845–851, jul. 2010.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, 1 jul. 2020.

CORTÉS-ESPINOSA, D. V. et al. Heterologous expression of manganese peroxidase in *Aspergillus niger* and its effect on phenanthrene removal from soil. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3–4, p. 120–129, 2011.

CRUZ, G. GOMES DA. **TRATAMENTO BIOLÓGICO DE ÓLEO DIESEL POR CONSÓRCIO FÚNGICO**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/28012/1/TESE%20Ge%20C3%B3rgia%20Gomes%20da%20Cruz.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2024.

DAÂSSI, D.; ALMAGHRIBI, F. Q. Soil Microcosms for Bioaugmentation With Fungal Isolates to Remediate Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soil. 2021.

DAÂSSI, D.; QABIL ALMAGHRIBI, F. Petroleum-contaminated soil: environmental occurrence and remediation strategies. **3 Biotech**, v. 12, n. 6, p. 139, 2022.

DANTAS, C. P. et al. Bioprospection of ligninolytic enzymes from marine origin filamentous fungi. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 93, 2021.

DELL'ANNO, F. et al. Degradation of hydrocarbons and heavy metal reduction by marine bacteria in highly contaminated sediments. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–18, 1 set. 2020.

DELL'ANNO, F. et al. Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the omics era. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 1 ago. 2021.

DINIS, M. J. et al. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4829–4835, out. 2009.

DOUGLAS SANTOS. **Vazamento de petróleo completa um ano sem solução**. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/?76948/Vazamento-de-petroleo-completa-um-ano-sem-solucao>>. Acesso em: 18 jul. 2023.

DUPREE, E. J. et al. **A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field**. **ProteomesMDPI AG**, , 1 set. 2020.

EL-GENDI, H. et al. **A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges**. **Journal of FungiMDPI**, , 1 jan. 2022.

El-hanafy. [s.d.].

ELISASHVILI, V. et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1091–1096, out. 2010.

EUZEBIO, C. S.; RANGEL, G. D. S.; MARQUES, R. C. DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO E SEUS IMPACTOS NO AMBIENTE E NA SAÚDE HUMANA. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 52, p. 79–98, 2 nov. 2019.

FABÍOLA ORTIZ. **Baía de Guanabara: vazamento da Petrobras completa 14 anos**. Disponível em: <<https://oeco.org.br/reportagens/28021-baia-de-guanabara-vazamento-da-petrobras-completa-14-anos/>>. Acesso em: 18 jul. 2023.

FALADE, A. O. et al. **Lignin peroxidase functionalities and prospective applications**. **MicrobiologyOpen** Blackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2017.

FARIA, R. D. A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Cerrioporiopsis subvermispora*. **Dissertação**, p. 1–102, 2010.

FENG, Q.-X. et al. **EOR Pilot Tests With Modified Enzyme-Dagang Oilfield, China**. [s.l: s.n.].

FERDINAND, P. U. et al. Biodegradation of hydrocarbons in a crude-oil polluted soil using peroxidase from fungal di-culture of *Rhizopus* and *Saccharomyces* spp. **Journal of Biotech Research**, 2020.

FLAYYIH, I.; AI-JAWHARI, H. Ability of Some Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 46–52, 2014.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3–14, 2014.

FRAGNER, D. et al. Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose. **Electrophoresis**, v. 30, n. 14, p. 2431–2441, 2009.

GARCÍA DE LLASERA, M. P. et al. Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3365–3375, 1 fev. 2016.

GASSEN, J. et al. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 541–547, 1 ago. 2015.

GESCHER, J. et al. Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 22, p. 6301–6315, nov. 2002.

GHOSAL, D. et al. **Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 31 ago. 2016.

GOMES, H. A. R. et al. **Revelando o potencial de *Clonostachys blyssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas**. Brasília: Universidade de Brasília-UnB, 2017.

GOODELL, B.; WINANDY, J. E.; MORRELL, J. J. **Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions**. **Coatings** MDPI AG, , 1 dez. 2020.

HAMMEL, K. E.; GREEN, B.; GAI, W. Z. **Ring fission of anthracene by a eukaryote (white-rot fungi/*Phanerochaete chrysosporium*/biodegradation/lignin peroxidase/polycyclic aromatic hydrocarbons)** **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. **Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals**. **Nature Reviews Microbiology**, mar. 2011.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Y.; HASTINGS, S.; MOMANY, M. The septin aspb in aspergillus nidulans forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 3, p. 311–323, mar. 2012.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.

HYDE, K. D. et al. **The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially**. **Fungal Diversity** Springer Netherlands, , 31 jul. 2019.

IHSANULLAH, I. et al. **Bioremediation of dyes: Current status and prospects**. **Journal of Water Process Engineering** Elsevier Ltd, , 1 dez. 2020.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION (IMO). Disponível em: <<https://www.imo.org/en>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

ISMAIL, N. A. et al. Influence of pH and concentration on the growth of bacteria - fungus and benzo[a]pyrene degradation. **Environmental Technology and Innovation**, v. 29, 1 fev. 2023.

JAISWAL, S.; SINGH, D. K.; SHUKLA, P. Gene editing and systems biology tools for pesticide bioremediation: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, 2019.

JANUSZ, G. et al. **Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution**. **FEMS Microbiology Reviews** Oxford University Press, , 1 nov. 2017.

KAPEUA-NDACNOU, M. et al. Assessing the Biocontrol Potential of Clonostachys Species Isolated as Endophytes from Coffea Species and as Mycoparasites of Hemileia Rusts of Coffee in Africa. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.

KELLNER, H. et al. Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 24 abr. 2014.

KHALID, F. E. et al. **Bioremediation of diesel contaminated marine water by bacteria: A review and bibliometric analysis**. **Journal of Marine Science and Engineering** MDPI AG, , 1 fev. 2021.

KLUCZEK-TURPEINEN, B. et al. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete Paecilomyces inflatus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 4, p. 374–379, 2003.

KLUCZEK-TURPEINEN, B. et al. Degradation and enzymatic activities of three Paecilomyces inflatus strains grown on diverse lignocellulosic substrates. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 4, p. 283–291, jun. 2007.

KUMAR A; BISHT B S; JOSHI V D. **Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool** **INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES**. [s.l: s.n.].

KUMAR, V. et al. Studies on the morphology, phylogeny, and bioremediation potential of *Penicillium citrinum* and *Paecilomyces variotii* (Eurotiales) from oil-contaminated areas. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 1, 1 jan. 2023a.

KUYUKINA, M.; KRIVORUCHKO, A.; IVSHINA, I. Hydrocarbon-and metal-polluted soil bioremediation: Progress and challenges. **Microbiology Australia**, v. 39, n. 3, p. 133–136, 2018.

LAMAR, R. T.; WHITE, R. B.; ASHLEY, K. C. Evaluation of white-rot fungi for the remediation of creosote-contaminated soil. **Remediation**, v. 12, n. 4, p. 97–106, 2002.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment** **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/mr>>.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. **Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment** **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/mr>>.

LEI, A. P. et al. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 273–280, jan. 2007.

LIANG, X. et al. Uranium phosphate biomineralization by fungi. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 2064–2075, 1 jun. 2015.

LILIANA SOLÓRZANO LEMOS, J. et al. **PETROLEUM DEGRADATION BY FILAMENTOUS FUNGI**. [s.l: s.n.].

LIMA, D. F. et al. Isolation and Selection of Fungi for Degrading Saturated Hydrocarbons, Aromatic Hydrocarbons and NSO Compounds. **Open Journal of Yangtze Oil and Gas**, v. 02, n. 01, p. 10–26, 2017.

LI, Q.; LIU, J.; GADD, G. M. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020.

LI, Q.; LIU, J.; GADD, G. M. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. [s.d.].

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. **Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential**. **Marine Drugs** MDPI AG, , 1 out. 2016.

LI, X. et al. Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 330, p. 1–8, 2017.

LOO, J. A. et al. **Application of Mass Spectrometry for Target Identification and Characterization**. [s.l: s.n.].

LOTFINASABASL, S.; GUNALE, V. R.; RAJURKAR, N. S. ASSESSMENT OF PETROLEUM HYDROCARBON DEGRADATION FROM SOIL AND TARBALL BY FUNGI. **Bioscience Discovery**, v. 3, 2012.

LU, X. et al. **The intra-and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/23><http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/23>>.

MACHÍN-RAMÍREZ, C. et al. Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 538–544, jul. 2010.

MACIEL et al. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **EXACTA- Engenharia de Produção**, v. 8, 2011.

MACIEL, M. J. M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T. **Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review**. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2010.

MALLA, M. A. et al. **Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 4 jun. 2018.

MANCERA-LÓPEZ, M. E. et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 151–160, mar. 2008.

MAO, J.; GUAN, W. Fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Scopulariopsis brevicaulis* and its application in bioremediation of PAH-contaminated soil. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 66, n. 5, p. 399–405, 3 jul. 2016.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127–3133, jul. 2001.

MARIANO, A. P. et al. USE OF WEATHERED DIESEL OIL AS A LOW-COST RAW MATERIAL FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION. v. 25, n. 02, p. 269–274, 2008.

MARTÍNKOVÁ, L. et al. **Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review.** *Chemosphere* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2016.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; GORBUSHINA, A. A.; TOEPEL, J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture- and qPCR-based approaches. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, p. 216–223, 1 jan. 2018.

MAZZOLI, R. et al. Degradation of aromatic compounds by *Acinetobacter radioresistens* S13: Growth characteristics on single substrates and mixtures. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 1, p. 55–68, jul. 2007.

MENEZES, B.; ROSSI, D.; AYUB, M. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, jul. 2017.

MITTAL, A.; SINGH, P. Studies on biodegradation of crude oil by *Aspergillus niger*. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 27, n. 1, p. 57, 2009.

MOHSENZADEH, F.; CHEHREGANI RAD, A.; AKBARI, M. Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 9, n. 26, 2012.

MOREIRA, G. et al. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. **Mycological Progress**, v. 15, p. 1–9, jun. 2016.

MOTA, MAURÍCIO. PRINCÍPIO DA PRECAUÇÃO NO DIREITO AMBIENTAL: UMA CONSTRUÇÃO A PARTIR DA RAZOABILIDADE E DA PROPORCIONALIDADE. **Revista Brasileira de Direito do Petróleo, Gás e Energia**, v. 2, 2006.

MURA, E. et al. Anaerobic fungal communities differ along the horse digestive tract. **Fungal Biology**, v. 123, n. 3, p. 240–246, 1 mar. 2019.

NASRAWI, H. AL. Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 03, n. 04, 2012.

NEFEDOV, A. V; GILSKI, M. J.; SADYGOV, R. G. **Bioinformatics Tools for Mass Spectrometry-Based High-Throughput Quantitative Proteomics Platforms.** [s.l: s.n.].

NORONHA, I. R. DE; FERREIRA, M. I. P.; PINTO, A. E. M. RISCOS E DANOS AMBIENTAIS ASSOCIADOS ÀS ATIVIDADES DA CADEIA PRODUTIVA DO

PETRÓLEO: INSTRUMENTOS DE COMANDO E CONTROLE PARA MITIGAÇÃO DOS IMPACTOS DE VAZAMENTOS DE ÓLEO. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 7, n. 1, p. 596, 19 fev. 2018.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119–124, 1 maio 2016.

NWANCHUKWU, S. U.; UGOJI, E. O. Impacts of crude petroleum spills on microbial communities of tropical soils. **International Journal of Ecology and Environmental Science** 21, v. 21, p. 169–176, 1995.

OBOH, B. O. et al. **Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit** *Nature and Science*. [s.l: s.n.].

OJUADERIE, O. B.; BABALOLA, O. O. **Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review**. **International Journal of Environmental Research and Public Health** MDPI, , 4 dez. 2017.

OSTREM LOSS, E. M.; YU, J. H. **Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene**. **Molecular Microbiology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 ago. 2018.

OZYUREK, S.; AVCIOGLU, N. H.; SEYIS BILKAY, I. Mycoremediation potential of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 10, p. 5937–5950, 1 dez. 2021.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 244—263, 2007.

PARSHIKOV, I. A.; WOODLING, K. A.; SUTHERLAND, J. B. **Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger***. **Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Verlag, , 18 set. 2015.

PEDERSEN, M. et al. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 743–748, maio 2007.

PENG, X.; VALENTINE, D. L. Diversity and n_2o production potential of fungi in an oceanic oxygen minimum zone. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 1 mar. 2021.

PERALES-VELA, H. V.; PEÑA-CASTRO, J. M.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. **Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae**. **Chemosphere** Elsevier Ltd, , 2006.

PETROBRAS. **Óleo Diesel Informações Técnicas**. Disponível em: <<http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/default.asp>>.

QAYYUM, H.; MAROOF, H.; YASHA, K. **Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: A review**. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2009.

QI, S. W. et al. Comparative proteomes of *Corynebacterium glutamicum* grown on aromatic compounds revealed novel proteins involved in aromatic degradation and a clear link between aromatic catabolism and gluconeogenesis via fructose-1,6- biphosphatase. *Proteomics*, v. 7, n. 20, p. 3775–3787, 2007.

QUEIROZ DE SOUZA, H.; OLIVEIRA, A. DE; ANDRADE, J. S. **Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico** Screening of basidiomycetes from Amazonia for the production of biotechnological interest enzymes *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [s.l: s.n.].

REIS, N. S. et al. Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multi-enzymatic extract of *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Communications*, v. 206, n. 3, p. 387–397, 4 mar. 2019.

REZAEI SOMEE, M. et al. Bioremediation of oil-based drill cuttings by a halophilic consortium isolated from oil-contaminated saline soil. *3 Biotech*, v. 8, n. 5, 1 maio 2018.

ROCHA, M. F. A. **BIODEGRADAÇÃO DE BIODIESEL DE ALGODÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO**. Recife: [s.n.].

ROGOWSKA, J.; NAMIEŚNIK, J. Environmental implications of oil spills from shipping accidents. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 206, p. 95–114, 2010.

SAKAGUCHI M, S. R. H. J. T. I. **Paecilomyces formosus**. In: *Paecilomyces*.

SALEEM, S.; ALI, T. A. **A COMPARISON OF THE RADIAL GROWTH OF ASPERGILLUS NIGER ON VARIOUS CULTURE MEDIA PREPARED BY THE PLANT BASED EXTRACTS AND POTATO DEXTROSE AGARINT**. *J. BIOL. BIOTECH.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.neogen.com/Acumedia/Product>.

SALGADO-BAUTISTA, D. et al. Solid-state fermentation increases secretome complexity in *Aspergillus brasiliensis*. *Fungal Biology*, v. 124, n. 8, p. 723–734, 1 ago. 2020.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, V. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-emulsifier protein produced by *Aspergillus brasiliensis* (niger) in an airlift bioreactor following an electrochemical pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 256, p. 408–413, 1 maio 2018.

SANDRIN, T. R.; MAIER, R. M. **Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. Environmental Health Perspectives** Public Health Services, US Dept of Health and Human Services, , 1 ago. 2003.

SATHISHKUMAR, Y. et al. Effect of low shear modeled microgravity on phenotypic and central chitin metabolism in the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 197–209, 2014.

SA, W.; O, A. Fungi in Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Oilfield Wastewater. **Acta Scientific Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 220–224, 1 abr. 2020.

SCHNEIDER, W. D. H. et al. High level production of laccases and peroxidases from the newly isolated white-rot basidiomycete *Marasmiellus palmivorus* VE111 in a stirred-tank bioreactor in response to different carbon and nitrogen sources. **Process Biochemistry**, v. 69, p. 1–11, 1 jun. 2018.

SCHROERS, H.-J. et al. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea* , its relationship to *Bionectria ochroleuca* , and notes on other *Gliocladium* -like fungi . **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 365–385, mar. 1999.

SCHROERS, H.-J. Generic delimitation of *Bionectria* (*Bionectriaceae*, *Hypocreales*) based on holomorph characters and rDNA sequences. **Studies in Mycology**, v. 2000, p. 63–82, jun. 2000.

SCHROERS, H.-J. **A monograph of bionectria (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its Clonostachys anamorphs**. 2001.

SCHWARZ, A. et al. Response of the fungal community to chronic petrogenic contamination in surface and subsurface soils. **Geoderma**, v. 338, p. 206–215, 2019.

SHARMA, R. et al. Responses of Phytochelatins and Metallothioneins in Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants: An Overview. Em: **Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 263–283.

SHARMA RANJU AND SINGH, N. S. AND D. N. AND P. T. Bioremediation of Oil-Spills from ShoreLine Environment. Em: OVES MOHAMMAD AND ANSARI, M. O. AND Z. K. M. AND S. M. AND M. I. I. I. (Ed.). **Modern Age Waste Water Problems : Solutions Using Applied Nanotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 275–291.

SHEN, G. et al. Influence of phenanthrene on cadmium toxicity to soil enzymes and microbial growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 12, n. 5, p. 259–263, set. 2005.

SHORT, J. W. Advances in Understanding the Fate and Effects of Oil from Accidental Spills in the United States Beginning with the Exxon Valdez. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 5–11, 1 jul. 2017.

SILVA, P. G. O. DA et al. Bioprospecção de fungos filamentosos isolados de sedimentos de mangue do estado de Pernambuco para biodegradação de petroderivados. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e11311931559, 4 jul. 2022a.

SILVA, P. G. O. DA et al. Bioprospecção de fungos filamentosos isolados de sedimentos de mangue do estado de Pernambuco para biodegradação de petroderivados. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e11311931559, 4 jul. 2022b.

SPERANDIO, G. B. **Caracterização enzimática do co-cultivo entre *Aspergillus brasiliensis* e *Trichoderma reesei* RUT-C30**. Brasília: Universidade de Brasília, 2022.

SPERLING. From proteomics to genomics. 2001.

STIEF, P. et al. Dissimilatory nitrate reduction by *Aspergillus terreus* isolated from the seasonal oxygen minimum zone in the Arabian Sea. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, 11 fev. 2014.

SU, Q. et al. Microbial Removal of Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soil under Arsenic Stress. **Toxics**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.

SUYAMUD, B. et al. Biotransformation of struvite by *Aspergillus niger*: phosphate release and magnesium biomineralization as glushinskite. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1588–1602, 1 abr. 2020.

SZEWCZYK, R. et al. Intracellular proteome expression during 4-n-nonylphenol biodegradation by the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 44–53, 2014.

SZEWCZYK, R. et al. Mechanism study of alachlor biodegradation by *Paecilomyces marquandii* with proteomic and metabolomic methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 291, p. 52–64, 1 jun. 2015.

TAKÁČOVÁ, A. et al. Biodegradation of Benzo[a]Pyrene through the use of algae. **Central European Journal of Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 1133–1143, 2014.

THE GUARDIAN. **Filipino activists appeal to British banks over region devastated by oil spill**. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/environment/2023/may/05/filipino-activists-appeal-to-british-banks-over-region-devastated-by-oil-spill-aoe>>. Acesso em: 18 jul. 2023a.

THE GUARDIAN. **Oil spill at sea: who will pay for Peru's worst environmental disaster?** Disponível em: <<https://www.theguardian.com/environment/2022/mar/07/oil-spill-at-sea-who-will-pay-peru-worst-environmental-disaster>>. Acesso em: 18 jul. 2023b.

TRIPATHI, V. et al. **Biotechnological Advances for Restoring Degraded Land for Sustainable Development. Trends in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 1 set. 2017.

VAKSMAA, A. et al. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, 6 mar. 2023.

VARGA, J. et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1925–1932, ago. 2007.

VELMURUGAN, N. et al. Proteomic analysis of the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. Strain SF-8 in response to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Botanica Marina**, v. 60, n. 4, p. 381–392, 1 ago. 2017.

VERDIN, A. et al. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 3, p. 171–174, abr. 2005.

VERMA, S.; KUILA, A. **Bioremediation of heavy metals by microbial process. Environmental Technology and Innovation** Elsevier B.V., , 1 maio 2019.

VESTH, T. C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri. **Nature Genetics**, v. 50, n. 12, p. 1688–1695, 1 dez. 2018.

VILLELA BARCZA, M. **Processos da Indústria Química**. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4565994/mod_resource/content/1/Petr%C3%B3leo>. Acesso em: 16 jul. 2023.

VOLKE-SEPULVEDA, T. et al. Secretomic Insight into Glucose Metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in Solid-State Fermentation. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3856–3871, 7 out. 2016.

WANG, W. et al. The oxidation of hydrocarbons by diverse heterotrophic and mixotrophic bacteria that inhabit deep-sea hydrothermal ecosystems. **ISME Journal**, v. 14, n. 8, p. 1994–2006, 1 ago. 2020.

XIANG, L. et al. Biodegradation of aromatic pollutants meets synthetic biology. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 153–162, 1 set. 2021.

XU, X. et al. **Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 29 mar. 2018.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. **Obligate oil-degrading marine bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology*, jun. 2007.

YANG, S. et al. Biodegradation of hydrocarbons by *Purpureocillium lilacinum* and *Penicillium chrysogenum* from heavy oil sludge and their potential for bioremediation of contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 178, 1 mar. 2023.

YUAN, H. et al. Characteristics of microbial denitrification under different aeration intensities: Performance, mechanism, and co-occurrence network. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 141965, 2021.

ZHANG. ProbID: A probabilistic algorithm to identify peptides through sequence database searching using tandem mass spectral data. 2002.

ZHANG, H. et al. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp.48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 265–277, 15 dez. 2016.

ZHAO, D. et al. Isolation and complete genome sequence of *Halorientalis hydrocarbonoclasticus* sp. nov., a hydrocarbon-degrading haloarchaeon. **Extremophiles**, v. 21, n. 6, p. 1081–1090, 1 nov. 2017.