

Remediação de solo contaminado com resíduo de óleo automotivo por fungos alóctones

A contaminação de ambientes por resíduos é uma realidade crescente. Dentre as técnicas utilizadas para recuperar áreas contaminadas está a biorremediação, que consiste no emprego de micro-organismos (fungos e bactérias) que utilizam composto xenobiótico como fonte de carbono, dentre os microrganismos degradadores os fungos se destacam pela capacidade de produzir enzimas. Diante dos expostos esse trabalho objetivou avaliar a efetividade de fungos filamentosos alóctones na remediação de um microcosmo de solo contaminado com óleo automotivo. O óleo utilizado no trabalho foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada ao detector massa (GC-MS). Fungos filamentosos selecionados através da técnica do indicador Diclorofenol Indofenol (DCPIP) foram avaliados quanto a produção das enzimas lipase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), além da citotoxicidade. Para isso, os fungos foram inoculados em meio mineral Bushnell Hass (BH) com concentrações crescentes de resíduo óleo automotivo (1%, 3% e 5%). Para avaliação da biodegradação no solo esterilizado e não esterilizado realizou-se um planejamento experimental do tipo Central Composto Rotacional (CCR) com o melhor fungo e a melhor concentração do resíduo. As variáveis independentes foram pH e concentração do inoculo enquanto que a dependente foi a atividade biológica. A degradação dos hidrocarbonetos foi avaliada nas condições que apresentaram maior atividade biológica. Foram utilizadas as linhagens de *Penicillium* spp., *Thricoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Coccidiodes* sp. A caracterização do resíduo mostrou compostos fenólicos, alcanos e alcenos. As três linhagens mais promissoras foram *Penicillium javanicum* (F2) e *Penicillium* sp. (F3) e *Penicillium simplicissimum* (F4). Na etapa de degradação o fungo *Penicillium simplicissimum* (F4) foi melhor na produção da enzima lignina peroxidase (LiP) com 1% de óleo lubrificante com menor toxicidade. O planejamento experimental demonstrou que o tratamento mais efetivo foi realizado em um solo não esterilizado quando a atividade biológica está mais relacionada com as bactérias presentes no meio. A cinética de degradação do solo não esterilizado demonstrou que a microbiota é capaz de degradar 100% de alcanos e alcenos, e 40% dos compostos fenólicos presente no resíduo. Com isto pode-se concluir que os fungos do gênero *Penicillium* spp. são promissores para serem utilizados na recuperação de ambientes contaminados com compostos hidrocarbônicos quando inoculados junto com a microbiota endógena utilizando a técnica de bioaumentação na biorremediação in situ. Isto sugere que esta técnica é promissora para ser utilizada em processos de contaminação pontual no ambiente.

Palavras-chave: Pesticidas; Reatores de solo; Biodegradação; Microcosmo; Microbiota.

Remediation of soil contaminated with automotive oil residue by allochthonous fungi

Contamination of environments by waste is a growing reality. Among the techniques used to recover contaminated areas is bioremediation, which consists of the use of microorganisms (fungi and bacteria) that use xenobiotic compounds as a carbon source. In view of those exposed, this work aimed to evaluate the evolution of allochthonous filamentous fungi in the remediation of a microcosm of soil contaminated with automotive oil. The oil used in the work was characterized by gas chromatography coupled to a mass detector (GC-MS). Filamentous fungi selected using the Dichlorophenol Indophenol indicator (DCPIP) technique were evaluated for the production of lipase enzymes, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP), in addition to cytotoxicity. For this, the fungi were inoculated in Bushnell Hass (BH) mineral medium with increasing concentrations of automotive oil residue (1%, 3% and 5%). To evaluate biodegradation in sterilized and non-sterilized soil, an experimental design of the Rotational Composite Center (RCC) type was carried out with the best fungus and the best residue concentration. The independent variables were pH and concentration of the inoculum while the dependent one was the biological activity. The degradation of hydrocarbons was evaluated under the conditions that showed the greatest biological activity. Strains of *Penicillium* spp., *Thricoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Coccidiodes* sp. The characterization of the residue showed phenolic compounds, alkanes and alkenes. The three most promising strains were *Penicillium javanicum* (F2) and *Penicillium* sp. (F3) and *Penicillium simplicissimum* (F4). In the degradation step, the fungus *Penicillium simplicissimum* (F4) was better in the production of the enzyme lignin peroxidase (LiP) with 1% lubricating oil, with less toxicity. biological is more related to the bacteria present in the environment. The degradation kinetics of non-sterilized soil showed that the microbiota is capable of degrading 100% of alkanes and alkenes, and 40% of the phenolic compounds present in the residue. With this it can be concluded that fungi of the genus *Penicillium* spp. are promising to be used in the recovery of environments contaminated with hydrocarbon compounds when inoculated together with the endogenous microbiota using the bioaugmentation technique in situ bioremediation. This suggests that this technique is promising to be used in processes of punctual contamination in the environment.

Keywords: Pesticides; Soil reactors; Biodegradation; Microcosm; Microbiota.

Topic: **Biotecnologia**

Received: **03/07/2022**

Approved: **29/07/2022**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Thais Melo Castelo Branco
Universidade Ceuma, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4665365713473930>
thameloo@outlook.com

Erik Jonne Vieira de Melo
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4950430416610137>
<http://orcid.org/0000-0002-3151-0949>
erikjonne@hotmail.com

Diana Duarte de Lira
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/0520325410602330>
dianalucindo@gmail.com

Pérsio Alexandre da Silva
Universidade Federal de Maranhão, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3937606565346612>
<http://orcid.org/0000-0002-6281-4515>
persiosilva@gmail.com

Weberjone Jorge Alves Teixeira
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3050849557278229>
<http://orcid.org/0000-0002-8573-6951>
weberjonet@bol.com.br

Paulo Cesar Mendes Villis
Universidade Ceuma, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7997037826193766>
<http://orcid.org/0000-0002-7730-3830>
paulo.villis@ceuma.br

Flavio Henrique Reis Moraes
Universidade Federal do Maranhão, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/3200286869636966>
<http://orcid.org/0000-0002-7765-4278>
fhmoraes@yahoo.com.br

Thalia Isadeley Oliveira dos Santos
Universidade Ceuma, Brasil
<http://orcid.org/0000-0001-5545-2125>
thaliaengenheiraambiental@gmail.com

Angela Falcai
Universidade Ceuma, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9374112086158829>
<http://orcid.org/0000-0002-6036-7504>
angela.falcai@ceuma.br

Edelvio de Barros Gomes
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/6876845132791603>
<http://orcid.org/0000-0003-4983-6282>
edeliogomes@gmail.com

Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9307221791191545>
<http://orcid.org/0000-0001-6700-9876>
normagusmao@gmail.com

Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Universidade Ceuma, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1952235749528138>
<http://orcid.org/0000-0003-2116-1797>
rita.miranda@ceuma.br



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2022.007.0017

Referencing this:

BRANCO, T. M. C.; MELO, E. J. V.; LIRA, D. D.; SILVA, P. A.; TEIXEIRA, W. J. A.; VILLIS, P. C. M.; MORAES, F. H. R.; SANTOS, T. I. O.; FALCAI, A.; GOMES, E. B.; GUSMÃO, N. B.; MIRANDA, R. C. M. Remediação de solo contaminado com resíduo de óleo automotivo por fungos alóctones. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.13, n.7, p.230-248, 2022. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2022.007.0017>

INTRODUÇÃO

A acumulação no solo de compostos tóxicos de origem hidrocarbônica pode causar morte ou mutações em animais e tecidos vegetais (ANDRADE et al., 2010), além de resultar em um aumento do teor de carbono orgânico do solo. Este aumento do teor de carbono orgânico, por sua vez, tanto pode ser utilizado para crescimento microbiano como pode ser tóxico para os micro-organismos, dependendo de sua natureza e da capacidade metabólica dos micro-organismos presentes.

A liberação de lubrificantes no meio ambiente ocasiona preocupação contínua devido ao seu impacto não quantificado e seu potencial dano crônico. Sabe-se que o processamento de lubrificantes automotivos em motores modifica suas propriedades físico-químicas devido à alta pressão e temperatura que promovem quebras nas cadeias de hidrocarbonetos. Além disso, o óleo lubrificante pode persistir por mais de seis anos em alguns ecossistemas. Mesmo em condições de laboratório, o metabolismo completo do óleo por micro-organismos pode demandar de semanas a meses (LOPES et al., 2010).

Os processos químicos e físicos usualmente são empregados na recuperação de áreas contaminadas. Entretanto, esses tipos de sistemas de tratamento requerem máquinas pesadas e as consequências ambientais desta remoção de poluentes podem resultar em poluição atmosférica maciça. Em virtude de tais características, as tecnologias biológicas são uma abordagem amplamente utilizada, econômica e sustentável (LOPES et al., 2010).

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de técnicas, que utilizam processos biológicos, aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente. Para isto, em geral, utilizam-se microrganismos, plantas ou produtos biológicos, como enzimas e componentes celulares, com a finalidade de realizar uma mineralização, a qual, resulta em gás carbônico e água como produtos finais (SMITH et al., 2016).

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários, etc. (MELO et al., 2008).

Nas últimas décadas, a utilização de fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de remediação de áreas impactadas vem crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (SMITH et al., 2016). Inúmeras espécies se destacam na assimilação hidrocarbonetos, dentre elas as do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, contudo esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (SMITH, 2016, citado por ROBERTS, 1992).

A espécie de fungo filamentoso *Penicillium sp.* Tem recebido muita atenção como potencial degradador de uma enorme quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Rápida taxa de crescimento, habilidade de crescimento sob diferentes condições ambientais e habilidade de usar uma enorme quantidade de fontes de carbono e nitrogênio como forma de obtenção de energia são algumas das

características desse gênero levadas em conta em estudos de biodegradação (HOSOGAI et al., 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos

Foram utilizadas sete linhagens de fungos filamentosos previamente isolados de solo contaminado com agroquímico, identificados por técnica clássica e por técnicas moleculares. Para identificação clássica em nível de gênero, as linhagens de fungos foram cultivadas por microcultivo em lâmina para observação das características micromorfológicas como conídios e conidióforos (PITT, 1988, 1991; SAMSON et al., 2004). A identificação molecular foi realizada a partir da amplificação do DNA das regiões ITS-1, ITS-2 e subunidade 5.8 S do rDNA. Foram utilizados os *primers* ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') para identificação das espécies conforme White et al. (1990).

Tratamento do resíduo

Foi utilizado óleo automotivo como fonte hidrocarbônica, cedido por oficina mecânica localizada na cidade de São Luís-MA, Brasil. O resíduo foi caracterizado quanto seus compostos hidrocarbônicos por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de Massa (CG/MS).

Para tal, uma amostra do resíduo foi fracionada (*Clean up*) em coluna vertical separativa de vidro de tamanho 30mm x 10.5mm a fim de se identificar as frações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP). A coluna foi empacotada com sílica ativada a 800°C e condicionada com 20 mL de hexano. Após o condicionamento foram transferidos 20 mg do extrato oleoso e eluídos com 12mL de hexano. Foram coletadas as primeiras frações (aqui denominadas F-I). Em seguida, a coluna foi tratada com 15 mL 1:1 (v/v) de benzeno/hexano e foram coletadas as frações seguintes (F-II). As frações F-I e F-II foram misturadas na proporção 1:1, e a mistura foi utilizada para análise de HTP.

Seleção das linhagens de fungos

Sete linhagens de fungos filamentosos, isoladas de solo contaminado com agroquímico coletados em uma plantação de hortaliças de agricultores familiares no povoado J. Lima em São Jose do Ribamar - MA, foram avaliadas quanto à biodegradação de resíduo de óleo automotivo. O método de Hanson et al. (1993) foi utilizado para seleção das cepas. Este método consistiu em incorporar ao meio o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) como aceptor de elétrons para testar a capacidade do microrganismo de utilizar o substrato de hidrocarbonetos observando a mudança de cor do DCPIP de azul (forma leucobásica) para incolor (reduzido). Esse ensaio foi realizado em tubos contendo 3mL de meio Bushnell Haas - BH (KH₂PO₄ 1,0g; K₂HPO₄ 1,0g; NH₄NO₃ 1,0g; MgSO₄.7H₂O 0,2g; FeCl₃ 0,05g; CaCl₂.2H₂O 0,02g; Agar 15,0g e H₂O 1000 mL), pH 7,0; uma suspensão microbiana padronizada em 10⁸UFC/mL, 250µL do resíduo oleoso e 250µL do indicador redox DCPIP. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, além do controle abiótico (indicador, hidrocarbonetos e meio BH) e do biótico (suspensão microbiana, indicador e meio BH) e mantido a 30C em

condições estáticas, por um período de cinco dias.

Tratamento do resíduo automotivo

A fim de estabelecer a melhor concentração e selecionar o melhor fungo para o tratamento de solo contaminado com o resíduo oleoso, o tratamento das diferentes concentrações de resíduo de óleo automotivo foi realizado em frascos agitados contendo 250mL de meio Bushnell Haas e três concentrações crescentes de resíduo (1%, 3% e 5%). Os frascos foram incubados em condições estáticas por 05 dias e a cada 24h foi avaliada a atividade das enzimas lignina peroxidase, lipase e manganês peroxidase, a citotoxicidade e a biomassa.

Caracterização enzimática

As atividades de enzimas fenoloxidasas (Lipase; Lignina Peroxidase, LiP e Manganês Peroxidase, MnP) foram quantificados em meio Bushnell Haas com concentrações crescentes (1%, 3% e 5%) do resíduo oleoso. Todas as atividades enzimáticas foram medidas espectrofotometricamente (Shimadzu™ 1240 UV / MINI). A atividade de Lipase foi determinada usando p-nitrofenol (410 nm) método de acordo com os procedimentos descritos por Buswell et al. (1995). A atividade de MnP foi medida pela oxidação direta de vermelho de fenol a 610 nm como determinado por Kuwahara et al. (1984). A mistura reativa consistiu de 500 µl de extrato enzimático; 100 µl de vermelho de fenol (0,01% p / v); 100 µl de lactato de sódio (0,25 M); 200 µl de albumina de soro bovino (0,5% p / v); 50 µl MnSO₄ (2 mM); 50 µl de peróxido de hidrogênio em solução tampão de succinato de sódio (20 mM, pH 4,5). A mistura foi incubada a 30°C por 5 min e a reação foi parada adicionando 40 µl de NaOH (2 N). A atividade do LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico como descrito por Buswell et al. (1995). A mistura reativa consistia de 1 ml de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH 3,0); 500 µl de álcool veratrílico (10 mM); 500 µl de peróxido de hidrogênio (2 mM) e 500 µl de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio e a absorbância foi determinada em 310 nm. Os resultados foram expressos em termos de unidade enzimática, que é definido como 1,0 µmol de produto formado por minuto sob o ensaio condições.

Quantificação da biomassa

A biomassa dos fungos selecionados, foi avaliada pela metodologia de massa seca através de técnica gravimétrica.

Avaliação da citotoxicidade do resíduo oleoso e seus intermediários de degradação

A avaliação da citotoxicidade com o resíduo oleoso tratado e não tratado foi realizada utilizando a técnica para células sanguíneas aderentes através da avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Para isso foi adicionada 200µL de uma suspensão celular padronizada em 3×10^5 cels/m em cada poço da placa e incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 24h.

Após este período as células foram tratadas com as soluções controle e o efluente tratado e não tratado e as placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ por um período de 48h, o meio foi retirado e os poços lavados com 200 µL de PBS à 37°C, posteriormente foi adicionado 100 µL de uma solução de MTT padronizada à 0,5mg/mL e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 3h. A solução de MTT foi retirada e adicionado nos poços 100 µL de DMSO (Dimetil sulfoxido) puro. As placas foram agitadas por 5min e depois permaneceram em repouso pelo mesmo período de tempo para realização da leitura à 540nm para a realização dos cálculos de acordo com metodologia preconizada por Jorge et al. (2008).

Determinação das melhores condições nutricionais para a atividade microbiana

Evidenciar o experimento em solo O desenho experimental foi realizado para obter as melhores condições de operação com solo esterilizado e não esterilizado usando a linhagem e a concentração de resíduo que mostrou uma maior atividade enzimática. Para isso, um desenho experimental rotacional composto central design (DCCR) foi aplicado através de um planejamento fatorial completo (11) com níveis -1 e +1, quatro pontos axiais (-1.41 e +1.41) e três pontos centrais (zero). Concentração de inóculo e pH foram as variáveis independentes e a taxa de respiração basal do solo no final do quinto dia foi a variável dependente. O plano consistiu em 11 experimentos e sua implementação foi realizado usando o software Statistic™ 6.0 SOFTWARE.

Avaliação da Atividade Biológica

A atividade biológica do solo durante o processo de degradação foi avaliada através da respiração basal do solo esterilizado e não esterilizado. Para tal foi utilizada foi realizada titulação volumétrica utilizando método proposto por Alef et al. (1995) como variável resposta do planejamento experimental. A metodologia foi realizada em frascos contendo o solo, umidade ajustada e 250µL de óleo lubrificante. Para avaliação do CO₂ demandado foram colocados nos frascos, pequenos recipientes contendo 10ml de NaOH. Durante o período de incubação (23 dias), o conteúdo dos recipientes foi regularmente substituído e, após a adição de 10 ml de BaCl₂ e 2 gotas de fenolftaleína, titulado em HCl, para determinar as concentrações de CO₂. A taxa de respiração em mg de C-CO₂ evoluído foi calculada por meio da equação 1:

$$(C - CO_2) = (B - V) \times M \times 6 \times \left(\frac{V_1}{V_2}\right) \quad \text{Equa. 1}$$

Onde B é o volume de HCl usado para titular o branco, V o volume de HCl utilizado para titular a amostra, M a molaridade real de HCl, 6 é a massa atômica do C (12) dividida pelo número de mols de CO₂ que reagem com o NaOH (2), V1 a quantidade de NaOH usado nos frascos e V2 a quantidade de NaOH usada na titulação.

Avaliação da degradação do resíduo oleoso e seus produtos intermediários por Cromatografia Gasosa acoplada ao Massa (CG/MS)

As frações hidrocarbônicas do resíduo in natura e após ter sofrido pelo processo de degradação (nas

melhores condições estabelecidas e após 23 dias) foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS). Análise CG-MS foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrômetro de Massa (Shimadzu TM, GC-MS Modelo: 17A / QP5050A) utilizando Coluna cromatográfica de tamanho 30m x 25µm, VB-5 de 0,25 mm e hélio como gás veicular. A temperatura do forno foi programada para aumentar linearmente de 50°C a 300°C aumentando 6°C/min, sendo mantida durante 20 min, a temperatura da interface será 280°C com fluxo de 1mL/min. Os principais compostos e os intermediários de degradação foram detectados pelo detector Espectrômetro de massa com modo de varredura *scan*, os intervalos de massa analisados foram de 40 a 350m/z em 63.67 min de análise. Para análise da degradação, as áreas dos picos mais significativos dos cromatogramas foram automaticamente calculados e os picos integrados automaticamente.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente quanto às diferenças significativas, por meio da análise de variância (ANOVA) para verificar a associação entre as variáveis.

RESULTADOS

Micro-organismos e resíduo

Os fungos selecionados para este trabalho foram isolados de solo contaminado com agrotóxicos e identificados em nível de gênero através da técnica de microcultivo por microscopia óptica. Dos sete fungos isolados obteve-se um do gênero *Trichoderma sp.* (F1), 01 Fungo não identificado (F2), 03 do gênero *Penicillium sp.* (F3, F4 e F5), 01 *Coccidioide sp.* (F6) e um do gênero *Aspergillus sp.* (F7).

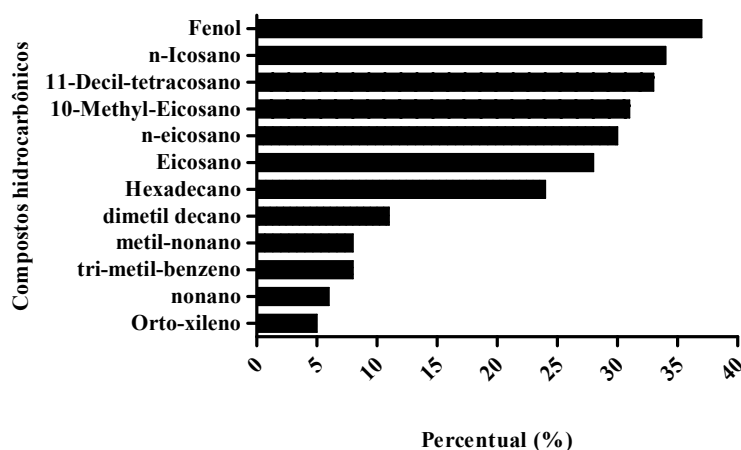


Figura 1: Caracterização do óleo automotivo usado quanto ao percentual de hidrocarbonetos totais.

As espécies *Penicillium javanicum.* (F3), *Penicillium sp.* (F4) e *Penicillium simplicissimum.* (F5) foram identificadas por biologia molecular.

O baixo quantitativo e diversidades apresentada no isolamento demonstra que houve influência da contaminação do solo pelo agroquímico. Ainda que o solo é um ambiente natural dos fungos, que estão

adaptados a suas condições nutricionais e físicas, a contaminação pelo composto químico influenciou diretamente na quantidade e na diversidade dos fungos isolados.

A caracterização do resíduo quanto aos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo pode ser visualizada na Figura 1.

Observa-se que o composto predominante é o fenol constituindo 40% de todo resíduo, seguido por compostos alcanos e alcenos com dez ou mais átomos de carbono. Os compostos aromáticos, constituídos de anel benzênico são os que apresentam menores percentuais na composição do resíduo. A presença desses compostos pesados, com cadeias carbônicas grandes e aromáticas pode ser explicada por se tratar de um resíduo de óleo que já passou por um processo térmico quando utilizado em motor de automóvel.

Dentre todos os compostos constituintes do resíduo é importante destacar a toxicidade do fenol, que é o composto predominante, por ter sua estrutura química formada por um anel benzênico ligado a duas hidroxilas, este composto é extremamente estável e de difícil degradação pela maioria dos organismos biológicos que possuem essa capacidade. Além do fenol, os demais compostos aromáticos presentes no resíduo contribuem para a toxicidade elevada do mesmo.

Seleção de linhagens para os testes de degradação o óleo automotivo

Os resultados do teste colorimétrico podem ser visualizados na Tabela 1 onde pode-se perceber que os seis microrganismos testados foram capazes de utilizar o resíduo óleos como fonte de carbono. A mudança de coloração, do azul para o incolor, do indicador DCPIP evidencia a troca de elétrons do microrganismo com o indicador, podendo não mudar, parcialmente ou totalmente de azul escuro para transparente.

Tabela 1: Discoloration of the DCPIP test by selected fungi using automotive oil residue as carbon source.

Microorganisms	Identification	Discoloration Time (h)		
		72	96	120
<i>Trichoderma sp.</i>	F1	+	+	++
Not identified	F2	-	-	-
<i>Penicillium sp.</i>	F3	+++	+++	+++
<i>Penicillium sp.</i>	F4	+++	+++	+++
<i>Penicillium sp.</i>	F5	+++	+++	+++
<i>Coccidioide sp.</i>	F6	+++	+++	+++
<i>Aspergillus sp.</i>	F7	+	++	++

+ descoloriu fracamente; ++ descoloriu medianamente; +++descoloriu fortemente.

O resultado do teste mostrou que todos seis fungos submetidos ao teste colorimétrico foram capazes de utilizar o óleo lubrificante usado como fonte de carbono no período do teste. Entre os seis fungos testados as três linhagens de *Penicillium sp.* demonstraram maior potencial de degradação por apresentarem viragem da cor do indicador de azul para incolor com até 72 horas de experimento. A linhagem de fungo do gênero *Coccidioides sp.* também demonstrou potencial na utilização do resíduo promovendo a viragem do meio de azul para incolor com 72 horas de experimentação. As linhagens de fungos do gênero *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* se mostraram mais lentas no processo de viragem, pois descoloriram parcialmente o meio com até 96 de incubação a 30°C.

O potencial dos fungos em utilizar resíduos de compostos hidrocarbônicos está diretamente

relacionado à produção de alguns metabólitos secundários, como enzimas e surfactantes. A produção envolve o contato das hifas com os compostos xenobióticos que possibilita uma aclimatação do microrganismo e com isso, um preparo metabólico que permitirá a produção e secreção desses compostos para o meio. A aclimatação envolve mecanismos de adaptação do microrganismo ao ambiente contaminado, uma fase de intensa atividade metabólica que implica na ativação de genes responsáveis pela produção e liberação de substâncias surfactantes e enzimas degradadoras.

Com a seleção dos fungos, foi realizada a identificação molecular das linhagens mais promissoras, sendo estas identificadas em nível de espécie como: *Penicillium javanicum* (F2), *Penicillium* sp (F3) e *Penicillium simplicissimum* (F4)

Caracterização enzimática e quantificação da biomassa

Todas as três linhagens (F2, F3 e F4), apresentaram capacidade de produzir a enzima lignina Peroxidase. Além dessa enzima, as linhagens F2 e F4 apresentaram capacidade de produzir a enzima Lipase, e a linhagem F3 apresentou capacidade de produzir a enzima Manganês Peroxidase.

Em relação a biomassa observa-se um perfil semelhante para as linhagens F2 e F3 ao longo dos cinco dias, quando o aumento da biomassa está diretamente relacionado ao aumento na concentração do poluente. Entretanto quando se observa o perfil de comportamento da linhagem F4 nota-se que há um aumento da biomassa nos primeiros dias (1 e 2) nas três concentrações de poluentes testadas, nos dias 3 e 4 ocorre uma diminuição da biomassa, principalmente nas concentrações mais baixas do poluente voltando a aumentar a concentração da biomassa no quinto dia demonstrando que esta linhagem necessita de um período de aclimatação maior que as outras (Figura 2)

A linhagem F2 apresentou uma maior capacidade na produção da enzima lignina peroxidase do que da lipase (Figura 1A e 1B). O pico de produção da enzima lignina peroxidase (2.868U/L) se deu no quarto dia de experimento quando se utilizou 3% de óleo automotivo como única fonte de carbono. O que se observou foi que esse perfil não acompanhou a produção de biomassa, a qual teve seu pico no quinto dia de experimento com 0,603g quando se utilizou 5% de óleo automotivo como única fonte de carbono. Esse perfil indica que a produção da enzima lignina peroxidase não está associada ao crescimento fúngico e que quanto mais óleo estiver disponível para o micro-organismo, irá produzir mais biomassa. A não associação de produção de enzima com aumento de biomassa é interessante do ponto de vista da indústria, considerando que o aumento da biomassa prejudica o funcionamento de reatores.

A linhagem *Penicillium* sp (F3) apresentou altos valores de atividade da enzima manganês peroxidase (30.555 U/L) quando utilizado 1% de óleo automotivo como fonte de carbono (Figura 2A). Assim como a linhagem *Penicillium javanicum* (F2), essa produção não está associada ao crescimento a biomassa que apresentou seu pico de produção no quinto dia com 0,6325g, quando utilizado 5% de óleo automotivo. Uma observação importante da produção de manganês peroxidase pela linhagem F3 é que, embora tenha havido uma pequena produção da enzima com a quantidade maior de poluente, os resultados mostram que uma

quantidade maior de compostos hidrocarbônicos impede a produção ou secreção da enzima para o meio externo, impedindo com isso que ocorra a degradação do óleo automotivo.

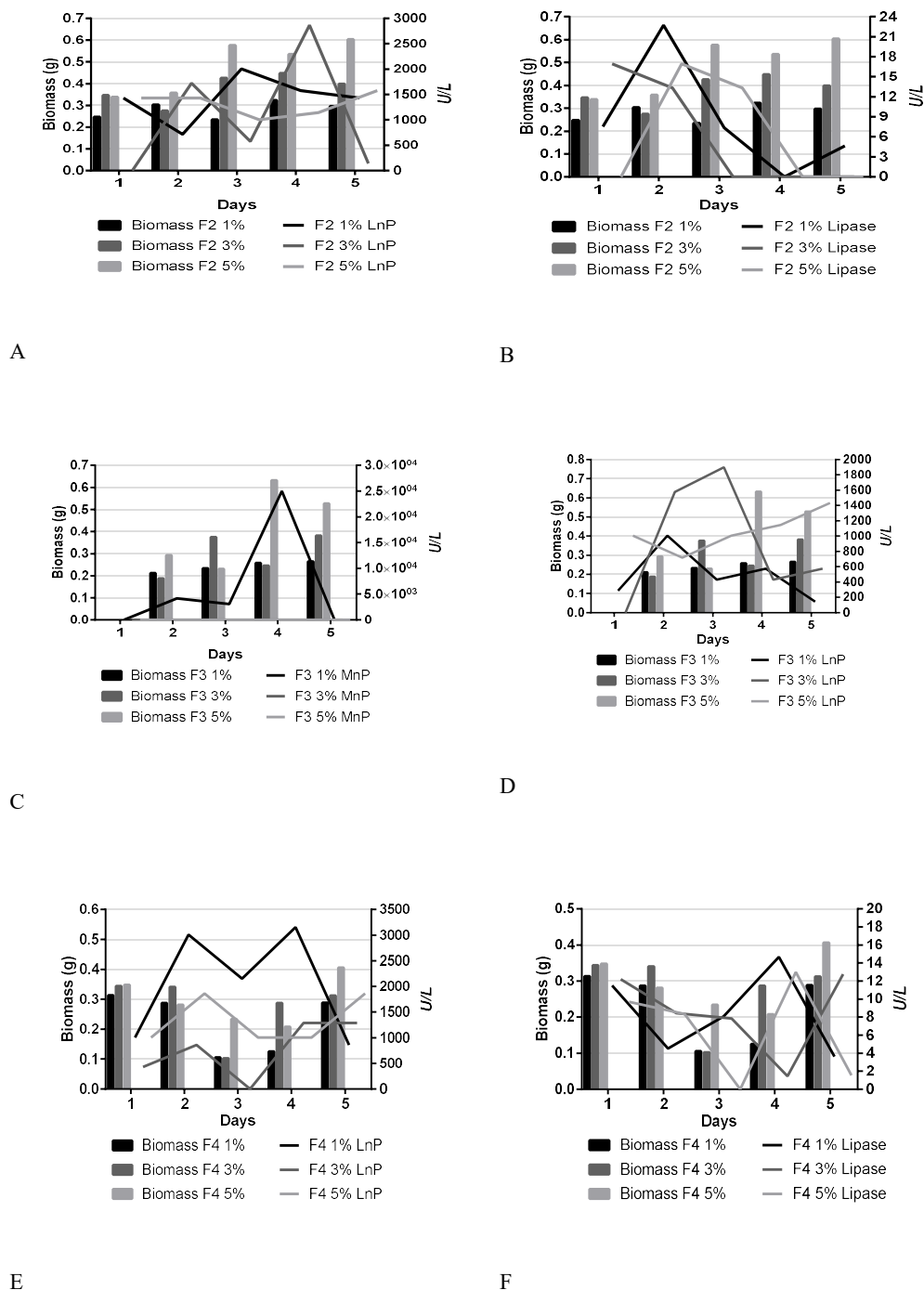


Figura 2: Biomassa versus atividade enzimática das enzimas Lignina Peroxidase e Lipase dos fungos F2 (A e B) e F4 (E e F) e Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase F3 (C e D)

A linhagem *Penicillium simplicissimum* (F4) apresentou uma maior quantificação da lignina peroxidase do que da lipase (Figura 2E e F). Da mesma forma que as demais linhagens os picos de atividade enzimática ocorreram nos experimentos com 1% de óleo, e a produção não está associada ao crescimento, pelo aumento da expressão.

Embora tenha sido semelhante às outras linhagens quanto a produção da enzima não estar associada

ao crescimento, pode-se observar um perfil diferente tanto na atividade enzimática quanto na produção de biomassa. Quando reportamos a da enzima lignina peroxidase pode-se observar dois picos de atividade, um no segundo dia e outro no quarto dia com valores em torno de 3.010U/L. A cinética de produção ao longo de cinco dias demonstra que ocorre um pico de atividade no segundo dia, decaindo no terceiro dia e voltando a crescer no quarto dia sendo este, o melhor dia com um pico de produção de 3.154U/L. Ao contrário das outras linhagens que mostraram apenas um dia ótimo de produção enzimática, a F4 apresenta a possibilidade de produção da enzima já no segundo dia de contato com o poluente, o que é promissor para indústria em termos de tempo de trabalho versus custo

Assim como o perfil de atividade enzimática, o perfil de crescimento da biomassa do fungo F4 também foi diferenciada. Observa-se que já ocorre um crescimento de massa fúngica no primeiro dia de ensaio, quando se utiliza 5% de óleo automotivo, essa biomassa decai no segundo até o quarto dia voltando a aumentar no quinto dia. Esse perfil ocorre para ambas as enzimas produzidas pela linhagem *Penicillium simplicissimum* (F4).

Esse perfil demonstra que, ao contrário das outras linhagens que tiveram um crescente na produção da biomassa ao longo dos cinco dias, a linhagem *Penicillium simplicissimum* (F4) já estava aclimatada para uma concentração maior de poluente, sendo o crescimento inibido, provavelmente, por algum intermediário de degradação a partir do segundo dia, e retomando o crescimento da biomassa no quinto dia para ambas as enzimas produzidas. Esse perfil demonstra que a linhagem F4 pode ser capaz de iniciar um processo de degradação já nas primeiras horas de contato além de suportar uma toxicidade maior dos compostos intermediários gerados ao longo da degradação

Assim, a linhagem F4 (*Penicillium simplicissimum*.) foi selecionada para os experimentos posteriores com 1% de óleo automotivo.

Avaliação da citotoxicidade do resíduo oleoso e seus intermediários de degradação

A citotoxicidade das três concentrações do resíduo de óleo automotivo tratado pode ser visualizada na Figura 3.

Para as três linhagens nas três concentrações testadas observou-se uma toxicidade maior do resíduo oleoso sem tratamento em relação aos tratados (F2, F3 e F4) nas diferentes concentrações do resíduo oleoso (1%, 3% e 5%). O resíduo oleoso proporciona um aumento de 199% na viabilidade celular, comparando com o meio de cultura puro (substrato padrão das células), o resíduo estimula o aumento do crescimento celular, proporcionando uma multiplicação desorganizada das mesmas. Essa característica demonstra que o resíduo oleoso devido a sua composição hidrocarbônica pesada pode ser um poluente cancerígeno.

A Figura 3A mostra a citotoxicidade das três concentrações de resíduo de óleo automotivo tratado pela linhagem *Penicillium javanicum* (F2). O perfil gráfico demonstra que na concentração de 1% de resíduo de óleo automotivo houve uma viabilidade maior que a do controle de vivos (100%) celular nos segundo e terceiro dias de tratamento do óleo pela linhagem *Penicillium javanicum* (F2). (105%). Esse perfil pode refletir

a mesma situação do óleo cru, onde é possível inferir que a toxicidade gerada pela presença do óleo estimulou o crescimento celular. Com essa mesma concentração de óleo testada observou-se que no primeiro e no quarto dia de tratamento que o valor da viabilidade celular foi próximo ao do controle de vivos (99% e 93%).

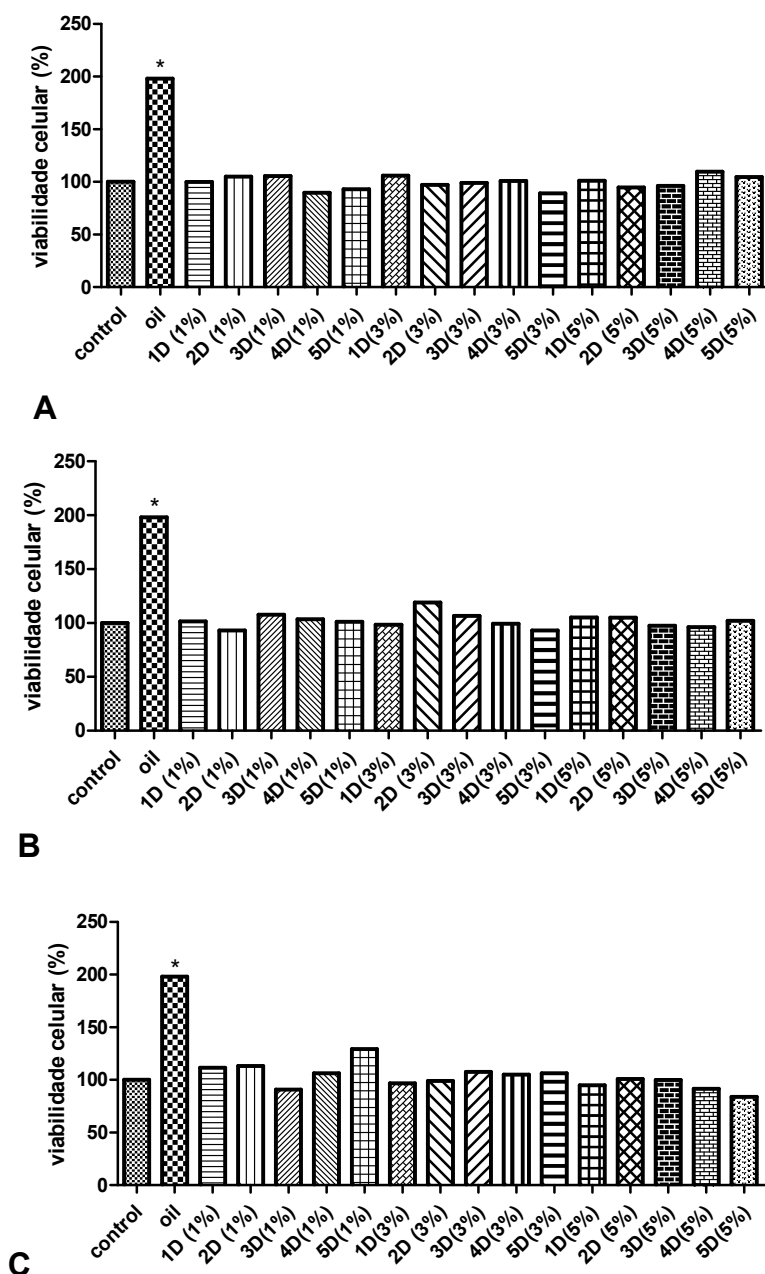


Figura 3: Citotoxicidade dos compostos de degradação nas três concentrações do óleo automotivo pelos fungos *Penicillium javanicum* (F2) 3A, *Penicillium* sp (F3) 3B and *Penicillium simplicissimum* (F4) 3C.

Quando a concentração de resíduo de óleo automotivo aumenta para 3%, observa-se que no quarto dia de tratamento o valor de viabilidade celular é de 100% igual ao do controle utilizado no trabalho. Outra observação interessante é que já no primeiro dia na concentração de 3% a viabilidade celular é maior que a do controle (105%) inferindo que nessa concentração ocorre um aumento desorganizado das células. O quarto dia também foi o que apresentou um maior acúmulo de biomassa demonstrando menos toxicidade.

Quando a concentração testada de resíduo automotivo foi 5% observou-se que no terceiro dia houve uma viabilidade celular de 96%, valor semelhante ao obtido pelo controle de vivo, o que pode ser corroborado com o crescimento da biomassa que foi elevado nessa concentração. Entretanto observa-se que esta concentração foi a que mostrou uma maior toxicidade, com viabilidade celular de 109% e 104% no quarto e quinto dia demonstrando um comportamento de estímulo a proliferação celular como o óleo puro.

A linhagem *Penicillium* sp. (F3) apresentou um perfil de toxicidade diferente da F2. Já na concentração de resíduo automotivo observou um aumento da toxicidade no primeiro, terceiro, quarto e quinto dia com valores de 101%, 107%, 103% e 101% respectivamente de viabilidade celular. Esse perfil demonstra que a concentração mais baixa de resíduo já foi mais tóxica para esse fungo, pois estimulou a proliferação celular. Esse comportamento foi observado no crescimento celular, que foi mais baixa do que a da linhagem F2 concentrações mais baixas. Quando a concentração de resíduo automotivo foi de 3% o seu tratamento pela linhagem F3 mostrou uma toxicidade mais alta, com o segundo e terceiros dias apresentando uma viabilidade celular de 119% e 103%, valores semelhantes aos do óleo puro demonstrando estímulo ao crescimento celular. O primeiro, quarto e quinto dias apresentaram valores próximos ao do controle de vivos sugerindo uma toxicidade mais baixa. Quando se relaciona com a biomassa, observa-se que o crescimento ocorre mais efetivamente a partir do quarto dia corroborando com os resultados da toxicidade. Ao contrário da linhagem F2, a concentração mais alta do resíduo oleoso (5%) não foi a mais tóxica para a linhagem F3. Observou-se que, embora no primeiro, segundo e quinto dias os valores de viabilidade celular estivessem mais altos que o do controle de vivos, eram mais baixos que o da concentração 3% demonstrando que a toxicidade não está diretamente relacionada com a concentração inicial do poluente e sim com seus intermediários de metabolização. O perfil da biomassa corrobora com esses dados, pois se apresentam mais baixas nos primeiros dias de tratamento, aumentando no quarto e quinto dia, demonstrando uma aclimatação dos fungos ao óleo e produtos de metabolização.

O perfil de toxicidade do tratamento do resíduo automotivo pela linhagem *Penicillium* sp. (F4) foi diferente daquele observado para as linhagens F2 e F3. Observou-se que o resíduo na concentração mais baixa já apresentava toxicidade tendo valores de viabilidade celular mais alto que a do controle de vivos nos: primeiro, segundo, quarto e quinto dia. O quinto dia foi o que apresentou a toxicidade mais alta com 126% de viabilidade celular. Ao contrário dos outros fungos, o aumento da biomassa foi nos dias que a viabilidade celular estava mais alta, sendo o quinto dia o que mostrou uma maior concentração de biomassa com 1% de resíduo de óleo automotivo. Quando a concentração do resíduo de óleo automotivo foi 3%, a toxicidade foi inferior a concentração 1%. Isso pode ser explicado pela facilidade de degradação do resíduo em concentração menor, gerando com isso metabólitos intermediários tóxicos. O segundo dia de tratamento mostrou um valor de viabilidade celular semelhante à do controle de vivos (99%), enquanto que a toxicidade aumentou no terceiro, quarto e quinto dias de tratamento (107%, 105% e 106% respectivamente). Assim como na concentração de 1% o perfil de crescimento de biomassa não está diretamente relacionado à toxicidade. Ao contrário das linhagens F2 e F3, a toxicidade foi a menor dentre todas as concentrações

testadas, quando o tratamento foi realizado com *Penicillium simplicissimum*. (F4) na concentração de 5%. O terceiro dia apresentou um valor de viabilidade celular semelhante ao do controle de vivos (99%). Quando se observa o crescimento da biomassa, nota-se que foi um dos dias de maior quantificação de massa seca nessa concentração.

Determinação das melhores condições nutricionais para a atividade microbiana

Avaliação da atividade biológica

Com a finalidade de estabelecer as melhores condições do processo e otimizá-las foi utilizado o planejamento experimental fatorial do tipo Central Composto Rotacional (DCCR) com o fungo selecionado na etapa anterior. Foram realizados 11 experimentos para o fungo F4 com solo esterilizado e não esterilizado totalizando 22 experimentos. Objetivando analisar a capacidade de sobrevivência e metabolização desses microrganismos foram simulados num microcosmo contendo solo contaminado com resíduo de óleo automotivo e, em cada frasco foram avaliados quanto a respiração basal dos microrganismos nas onze condições preconizadas pelo planejamento experimental. Os resultados podem ser visualizados na figura 4 (A e B).

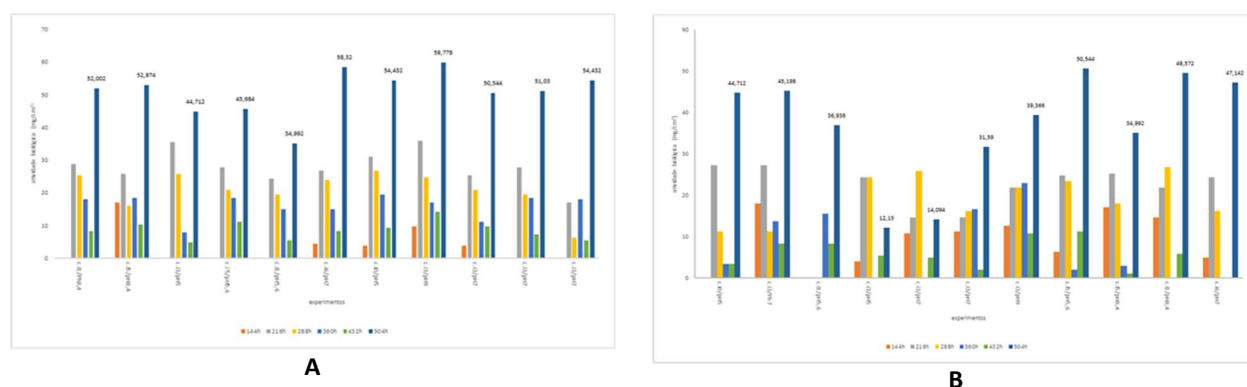


Figura 4: Atividade biológica do fungo *Penicillium simplicissimum* (F4) nos onze experimentos recomendados para o solo não esterilizado (4A) e esterilizado (4B).

O planejamento experimental é uma metodologia estatística que tem como principal objetivo a confiabilidade dos resultados com uma quantidade mínima de experimentos que garanta o grau de liberdade.

Na figura 4 pode-se observar o perfil da atividade biológica do sexto até o vigésimo primeiro dia de tratamento do solo contaminados com 1% de resíduo de óleo automotivo. Nos onze experimentos realizados para os dois tipos de solo, observou-se uma maior atividade biológica com 504 horas (21 dias) de inoculação com demandas de CO₂ nos frascos variando de 34,9mg/cm³ a 54,3 mg/cm³ quando utilizado o solo não esterilizado e 12,5 a. 50,5 mg/cm³ quando utilizado o solo esterilizado. O perfil de respiração foi muito semelhante tendo nos dois planejamentos uma maior taxa de respiração no vigésimo primeiro dia. Entretanto as condições que demonstraram uma maior taxa de respiração são diferentes para os solos estudados.

Quando o tratamento foi realizado em um solo não esterilizado (Figura 4A) observa-se que a maior taxa de respiração basal é quando se inoculou 3 blocos padronizados a 10^8 UFC e pH 9 mostrando com isso que a atividade biológica está mais relacionada com as bactérias presentes no meio do que com o fungo inoculado já que o pH alcalino favorece a atividade bacteriana. Já quando o tratamento foi realizado em um solo esterilizado, a maior atividade respiratória foi com 5 blocos padronizados a 10^8 UFC e pH 5,6 demonstrando que houve uma participação efetiva do fungo na degradação dos hidrocarbonetos constituintes do resíduo de óleo utilizado na contaminação do solo já que, não havia nenhuma outra microbiota atuando no solo. A cinética de atividade biológica do solo não esterilizado e esterilizado podem ser visualizadas na figura 5.

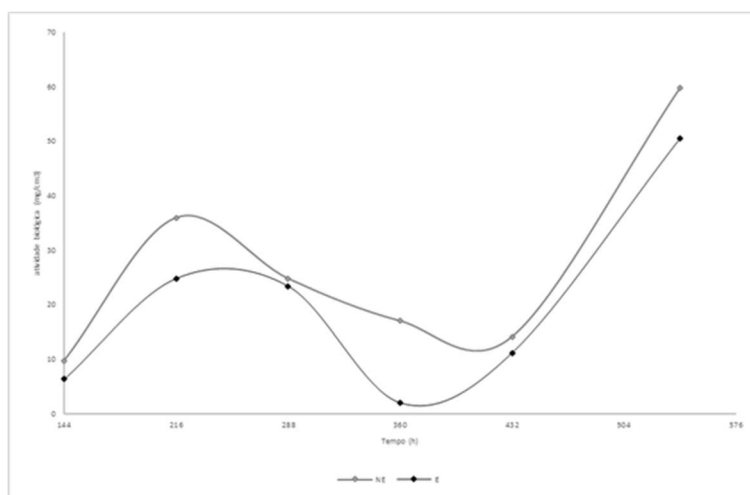


Figure 5: Cinética de atividade biológica do fungo *Penicillium simplicissimum*. (F4) em solos esterilizado (E) e não esterilizado (NE).

A cinética da atividade biológica demonstra que tanto no solo não esterilizado quanto esterilizado a respiração basal da comunidade microbiana presente no solo inicia baixa com 144 horas, aumentando com 216 horas, tendo uma queda com 360h e voltando a subir com 504h, ou seja, ao final dos 21 dias. Esse perfil indica que o fungo é capaz de utilizar o hidrocarboneto presente no solo como fonte de carbono já que a atividade biológica do solo esterilizado foi semelhante ao do solo não esterilizado ao final do experimento. Entretanto é importante ressaltar que o valor da atividade biológica do solo não esterilizado foi maior, indicando que possivelmente a eficiência de gradação é maior quando mais de uma comunidade microbiana atua.

A metodologia de superfície de resposta denominada em inglês por RSM (Response Surface Methodology) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolver, melhorar e otimizar uma resposta de interesse, que é influenciada por diversas variáveis dentro de um processo de medição e análise experimental (MYERS et al, 2009). A fim de determinar as condições ótimas do processo de tratamento que continha os fungos *Penicillium simplicissimum* (F4) nos solos não esterilizados e esterilizados foram estabelecidos os modelos predito 1e 2 para a variável atividade biológica.

$$\text{Atividade Biológica (\%)} = 152 + 67x_1^2 + 6.2x_2 + 18x_2^2 \quad \text{Modelo 1}$$

$$\text{Atividade Biológica (\%)} = 182 + 116x_1^2 + 108x_2 + 116x_2^2 + 701x_{1,2} \quad \text{Modelo 2}$$

A partir dos modelos, foi gerado os gráficos superfície de resposta da variável atividade biológica para os tratamentos com adição do fungo filamentososo e levedura, onde pode-se visualizar a tendência para os valores ótimos de tratamento do solo contaminado. Quando se considera a variável atividade biológica, a tendência pode ser visualizada nas figuras 6A e 6B.

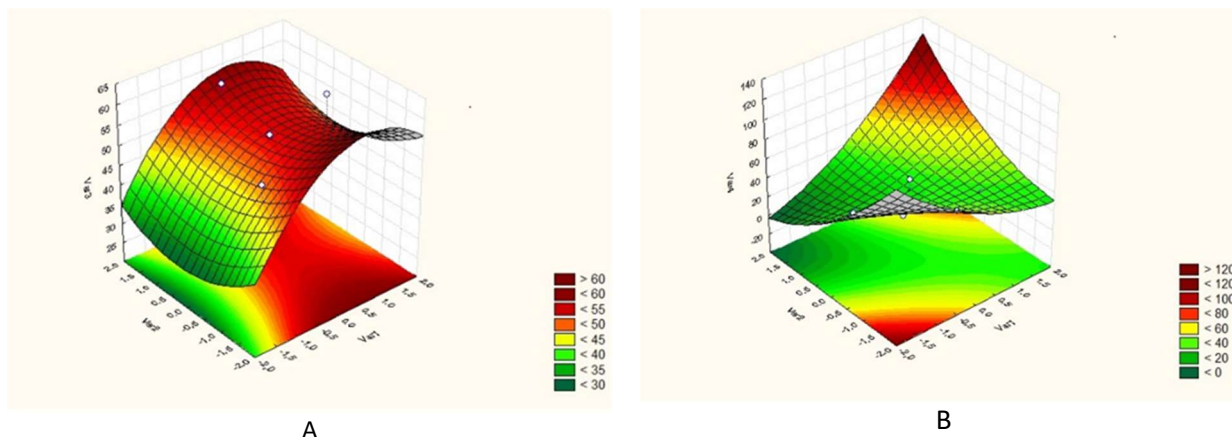


Figura 6: Gráfico superfície resposta gerado a partir do experimento realizado com valores obtido no planejamento experimental central composto rotacional.

Pode-se observar que existe uma região que concentração este parâmetro, que são as áreas em vermelho escuro, e uma região de baixa concentração, que são as áreas mais claras e amarelas. Pode-se verificar que quando o solo não estava esterilizado observou-se um ponto de inflexão quando a atividade biológica é mais alta, os valores de inóculo são medianos e o pH é mais alto. Já quando o solo está esterilizado observou-se a existência de um apontamento para valores mais altos de atividade biológica quando os valores do inóculo são mais altos (vermelho escuro) enquanto que o pH está na região mais baixa. A tendência foi diferente para as duas condições propostas no trabalho. Quando o tratamento foi realizado no solo não esterilizado os valores ótimos do processo para a atividade respiratória foram 3 blocos padronizados a 10⁸UFC e pH 9, já quando o tratamento foi realizado em um solo esterilizado, os valores ótimos para a maior atividade respiratória foram com 5 blocos padronizados a 10⁸UFC e pH 5,6

Avaliação da degradação do resíduo oleoso e seus produtos Intermediários por Cromatografia Gasosa acoplada ao Massa (CG/MS)

O percentual de degradação do resíduo de óleo automotivo após tratamento no solo não esterilizado na condição estabelecida no experimento 6 (5 blocos padronizado a 10⁸ e pH 9) pode ser observado na figura 7.

O percentual de degradação dos hidrocarbonetos foi avaliado em CG-MS após 23 dias de tratamento na melhor condição estabelecida no planejamento experimental no solo não esterilizado. O gráfico demonstra que os compostos orto-xileno, nonano, tri-metil-benzeno e dimetil decano foram 100% degradados pela microbiota presente no solo. Este fenômeno pode ser explicado pela facilidade dos fungos em adsorver os compostos por sua morfologia de hifas e pela quantidade desses no resíduo sem tratamento que era menor que os outros. O fenol foi o composto que apresentou o menor percentual de degradação

(40%), entretanto é o composto predominante no resíduo, aproximadamente 40% do resíduo *in natura* é composto por fenóis o que torna a degradação extremamente eficiente do ponto de vista de diminuição de compostos tóxicos. Esse resultado é corroborado quando se faz a análise da citotoxicidade, onde observa-se um óleo extremamente tóxico quando não tratado. Sua toxicidade diminui quando submetido ao tratamento pelo fungo em diferentes concentrações do resíduo.

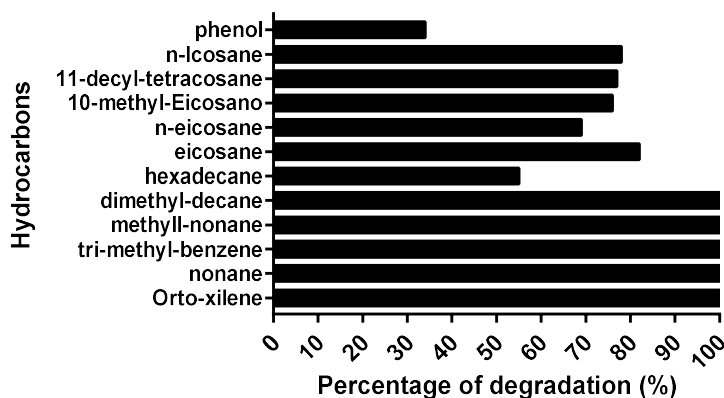


Figura 7: Percentual de degradação dos hidrocarbonetos do óleo usado após o tratamento do solo não esterilizado utilizando fungo *Penicillium simplicissimum* (F4) em pH 9.

DISCUSSÃO

A aplicação biotecnológica de fungos filamentosos no processo de recuperação de áreas contaminadas é importante processo, sendo os pertencentes ao gênero *Penicillium sp.* conhecidos na literatura por seu grande potencial em degradar hidrocarbonetos por meio de seus mecanismos extracelulares. Yan et al. (2017) reporta que espécies do gênero *Penicillium sp.* são capazes de degradar altas taxas de petróleo cru, composto altamente complexo.

Lopes et al. (2010) dizem que a técnica de 2,5-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é amplamente relatada, a qual é baseada na redução da forma oxidada pela mudança da cor de azul para incolor. Desde então, vários autores têm utilizado a técnica como alternativa para a seleção de microrganismos degradadores. O potencial de microrganismos isolados de ambientes contaminados com resíduos petrodirecionados em hidrocarbonetos degradantes foi avaliado utilizando a técnica de descoloração indicada pelo DCPIP. Os autores relatam a seleção de microrganismos que apresentaram potencial de degradação com até 24 horas de testes (MIRANDA et al., 2007). Atualmente, a técnica ainda é amplamente utilizada. Almeida et al. (2017) usaram a técnica do indicador redox DCPIP para selecionar o melhor consórcio microbiano capaz de degradar o combustível marítimo MF-8. Os autores relataram que obtiveram descoloração por um consórcio composto por bactérias diferentes em 24h. Joy et al. (2017) utilizaram a técnica do Diclorofenol Indolfenol (DCPIP) para selecionar microrganismos degradadores de óleo cru. Os autores relataram e enfatizaram a eficiência e rapidez da técnica quando se faz necessário uma seleção mais rápida com muitos microrganismos. Marchand et al. (2017) relataram o uso da metodologia DCPIP para selecionar bactérias e fungos com potencial de degradação do petróleo bruto. Os autores enfatizaram a eficiência e velocidade da técnica. Adnan et al.

(2018) utilizaram a técnica de DCPIP para estimar a capacidade de fungos do gênero *Penicillium sp.* na degradação do petróleo bruto. Os autores relataram que a alteração da coloração de azul para incolor em 14 dias a 30 ° C de incubação determinou que os fungos tinham a capacidade de degradar o óleo.

A caracterização enzimática mostrou que a produção das enzimas manganês peroxidase e lipase não foi significativa, com muitos valores igual a zero. No entanto para a enzima lignina peroxidase os valores foram significativos, especialmente para o F4 e na concentração de 1% de óleo lubrificante, sugerindo que a concentração do xenobiótico pode interferir diretamente na excreção das enzimas pelos microrganismos. Tal enzima é reconhecida fenoloxidase não específica, ou seja, tem a capacidade de utilizar diversos substratos como fonte de nutrição, tendo papel importante na degradação de compostos fenólicos, não-fenólicos e aromáticos, segundo Bidoia et al. (2004). Vários autores relatam a utilização de enzimas para a recuperação de ambientes contaminados por moléculas xenobióticas. Almeida et al. (2012) relataram a seleção de fungos produtores de enzimas oxidativas, os autores relataram que dos 37 fungos testados 56,7% demonstraram potencial para a produção de enzimas lignolíticas. Dentre os fungos selecionados, o *Penicillium sp.* FDG 36 se mostrou o melhor produtor de enzimas lacase. Após 120h de tratamento de meio contaminado com compostos xenobióticos. Baptista et al. (2015) relatam o isolamento de fungos do gênero *Penicillium sp.* e *Arpergillus sp.* de ambiente marinho contaminado com esgoto doméstico. Os autores enfatizaram que várias espécies de fungos dos dois gêneros foram capazes de produzir as enzimas Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase, e que essa produção foi acentuada após submeter esses organismos a radiação gama.

Na verificação da respiração basal do solo pudemos inferir que nos tratamentos com solo não-estéril a respiração teve sua melhor taxa na última leitura (23º dia) coincidindo com a melhor leitura dos tratamentos com solo estéril. Tal resultado sugere que provavelmente o fungo que foi inoculado passou a agir com predominância tanto no solo estéril como no não-estéril, evidenciando a grande capacidade do gênero *Penicillium sp.* em adaptar-se a condições adversas, no estudo em questão, a contaminação do solo por um xenobiótico com valores altos de toxicidade como é o óleo lubrificante automotivo usado/contaminado. As melhores taxas de respiração de cada tratamento tiveram valores de pH variando de 5,6 a 9 o que reafirma o potencial dos fungos filamentosos de se adaptarem a grandes variações de pH. Corroborando com este trabalho, Almeida et al. (2017) utilizaram a metodologia de planejamento experimental para estabelecer as melhores condições de degradação de combustível marítimo MF-8 por consórcio microbiano. Yan et al. (2017) utilizaram a metodologia de planejamento experimental para estabelecer as condições ótimas para a degradação de 3,5-dimetil-4,6-diclorofenol por um fungo isolado de resíduo salino. Os autores relataram que o isolado foi identificado em nível de gênero como sendo *Penicillium sp.* e as condições ótimas de salinidade, pH e temperatura foram estabelecidas através da metodologia de superfície resposta. Ao contrário deste trabalho Birolli et al. (2018) isolaram vários fungos ascomycota, incluindo o gênero *Penicillium sp.* dentre todos os isolados o que mais se destacou na degradação do antraceno em meio mínimo salino sob agitação de 130rpm, ao longo de 14 dias em uma concentração inicial

de 50mg/mL foi o fungo *Cladosporium sp.* Em relação a toxicidade, não se encontra muitos relatos da relação de compostos hidrocarbônicos com o aumento da citotoxicidade, entretanto sabe-se que os resíduos compostos de hidrocarbonetos são tóxicos para diversos organismos na natureza. Mazzeo et al. (2016) relataram que os resultados positivos obtidos com Salmonella/microssoma (a partir dos 6 meses) sugerem uma ação combinada de substâncias hidrocarbônicas provocando mutagenicidade. Hara et al. (2017) realizaram o teste do micronúcleo com cultura de células de mamíferos e observaram que o efluente, após o tratamento induziu um aumento significativo nas frequências dos micronúcleos indicando mutagenicidade das amostras tratadas e não tratadas.

CONCLUSÕES

Esse estudo evidencia a alta capacidade que os fungos filamentosos têm de, por meio de seus mecanismos de ação, atuarem nos processos de recuperação de áreas contaminadas com compostos xenobióticos, especialmente resíduos oriundos da indústria petrolífera. Tal fato é evidenciado quando se emprega fungos alóctones para tratamento de ambientes impactados e as taxas de degradação dos compostos hidrocarbônicos são substancialmente altas. Ratificamos ainda que o gênero *Penicillium sp.* é capaz de promover altas taxas de biodegradação em pouco tempo, informação de grande interesse e que serve como suporte para a tomada de decisões na remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

REFERÊNCIAS

ADNAN, B.; HAWASH, A. L.; JAWADAYN, T. A.; ABBOOD, H. A.; ZHANG, J.; SUN, J.; ZHANG, X.; MA, F.. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field. **Biotechnology Reports**, v.17, p.104-109, 2018.

ALEF, K.; NANPIPERI, D.. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London, 1995.

ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. S. P.; SILVA, R. O.; LIMA, G. M. S.; GUSMÃO, N. B.; SOUSA, M. F. V. Q.. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.116, p.73-82, 2017.

ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; MENDONÇA, R. C.; MACIEL, C. C. S.; GUSMÃO, N. B.. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v.8, p.1-10, 2012.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F.. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Seus Derivados. **Eclética Química**, v.35, n.3, p.17- 43, 2010.

BAPTISTA, N. M. Q.; SOLIDONIO, E. G.; ARRUDA, F. V. F.; MELO, E. J. V.; CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; CALLIU, M. J. A.; MIRANDA, R. C. M.; COLAÇO, W. GUSMÃO, N. B.. Effects of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. African. **Journal of Biotechnology**, v.14, p.612-621, 2015.

BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F.; CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e Refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.99-106, 2004.

BIROLI, W. G.; SANTOS, D. A.; ANUSKA, N. A.; GARCIA, C. F. S.; ROMÃO, L. P. C.; PORTO, A. L. M.. Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium sp.* CBMAI 1237. **Marine Pollution Bulletin**, v.129, n.2, p.525-533, 2018.

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

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

HARA, R. V.; MORALES, M. A. M.. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere**, v.174, p.321-330, 2017.

HOSOGAI, T.; FUZISAWA, S.; GOVARTHANAM, M.; CHANG, Y.. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium sp* CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. **RSC Advances**, v.7, p.20716-20723, 2017.

JORGE, M. P.; MADIAROF, C.; RUIZ, A. L. T. G.; FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, R. A. F.; SOUSA, I. M. O.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.361-366, 2008.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S.; SHARMA, S.. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**, v.317, p.232-241, 2017.

LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; DOMINGUES, R. F.; BIDOIA, E. D.. Toxicity and Biodegradation in Sandy Soil Contaminated by Lubricant Oils. **Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology**, v.84, n.4, p.454-458, 2010.

MARCHAND, C.; ARNAUD, M. S.; HOGGLAND, W.; BELL, T. H.; HIJRI, M.. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.16, p.48-57, 2017.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MORALES, M. A. M.. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v.163, p.508-515, 2016.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.. Microbiologia ambiental. In: **Como isolar microrganismos degradadores de moléculas**.

xenobióticas. 2 ed. São Paulo: Jaguaraiuna, 2008. p.167-183.

MIRANDA, R. C. M.; SOUZA, C. S.; GOMES, E. B.; LOVAGLIO, R. B.; LOPES, C. E.; SOUSA, M. F. V. Q.. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco/Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.1, p.147-152, 2007.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; COOK, C. M. A.. **Response surface methodology**. New York, 2009.

PITT, J. I.. A laboratory guide to common *Penicillium* species. **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, v.116, p.106-109, 1988.

ROBERTS, E. R.. **Bioremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Raton, 1992.

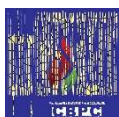
SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C.. **Studys in Micology (Ed) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites**. 2 ed. Badajoz, 2004.

SMITH, W. S.; SOUSA, K. C.; TANABE, A. K. R.; SABONARO, D. Z.. Biorremediação de solos contaminado por hidrocarbonetos utilizando fungos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.14, p.43-52, 2016.

YAN, Z.; HE, H.; YANG, C.; ZENG, G.; LUO, L.; JIAO, P.; LI, H.; LU, L.. Biodegradation of 3,5-dimethyl-2,4-dichlorophenol in saline wastewater by newly isolated *Penicillium* sp. yz11-22N2. **Journal of Environmental Science**, v.57, p.211-220, 2017.

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.

Todas as obras (artigos) publicadas serão tokenizadas, ou seja, terão um NFT equivalente armazenado e comercializado livremente na rede OpenSea (https://opensea.io/HUB_CBPC), onde a CBPC irá operacionalizar a transferência dos direitos materiais das publicações para os próprios autores ou quaisquer interessados em adquiri-los e fazer o uso que lhe for de interesse.



Os direitos comerciais deste artigo podem ser adquiridos pelos autores ou quaisquer interessados através da aquisição, para posterior comercialização ou guarda, do NFT (Non-Fungible Token) equivalente através do seguinte link na OpenSea (Ethereum).

The commercial rights of this article can be acquired by the authors or any interested parties through the acquisition, for later commercialization or storage, of the equivalent NFT (Non-Fungible Token) through the following link on OpenSea (Ethereum).



<https://opensea.io/assets/ethereum/0x495f947276749ce646f68ac8c248420045cb7b5e/44951876800440915849902480545070078646674086961356520679561157951737871466497/>