



FLÁVIA VIRGINIA FERREIRA DE ARRUDA

**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* E
*Penicillium commune***

**RECIFE
FEVEREIRO/2011**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* E
*Penicillium commune***

**FLÁVIA VIRGÍNIA FERREIRA DE
ARRUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos Industriais

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Ester Ribeiro Gouveia

RECIFE
FEVEREIRO/2011



**DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* E
*Penicillium commune***

FLÁVIA VIRGINIA FERREIRA DE ARRUDA

Data da defesa: 18/02/2011

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr.^a. Norma Buarque de Gusmão (orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Edelvio de Barros Gomes
Universidade Federal de Sergipe

Dr.^a. Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Arruda, Flávia Virgínia Ferreira de

Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*/ Flávia Virgínia Ferreira de Arruda. – Recife: O Autor, 2011.

55 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Coorientador: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2011.

Inclui bibliografia

1. Biodegradação 2. Fungos 3. Óleo diesel I.Título.

620.11223

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-231

Aos meus familiares e amigos por acreditarem
em mim, sempre.

Agradecimentos

A Deus, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais Marcelo e Edneide que acreditaram em mim.

Ao meu irmão Jeimes e aos meus primos Edney, Eduardo, Ivo.

A minhas queridas primas/ irmãs: Bel, Lu, Fabí e Kátia por acreditarem em mim e me apoiarem a seguir adiante.

A minha avó Edite, aos meus tios e tias, primos e primas, comadres e compadres e todos os meus familiares que torceram por mim.

A Sophia, Joana, Duda e Reginaldo pelos momentos de alegrias e descontração.

A Aliny por me incentivar, acreditar em mim, me acompanhar, por me ajudar, pela sua amizade, companheirismo, carinho e força.

A professora Norma pelo carinho, confiança, amizade, por me aceitar e me orientar durante tantos anos.

A minha co-orientadora Dr^a. Ester Ribeiro Gouveia pela ajuda e explicações.

A Michelle Rose por me ensinar os primeiros passos no mundo da pesquisa.

Aos meus amigos do ASA, em especial a Simone, Sheyla, Virgínia, Tati, Flávia. Lopes, Gleyson, Paula, Chris e José Roberto que acompanharam e acompanham o meu crescimento.

Aos meus amigos de graduação em especial a Nana, Raul, Geórgia, Joana, Mari, Hayana, Kênia, Carla Lêdo.

A Wanessa e Chris minhas amigas de longa data, a Jéssica, Érica, Paulas.

Aos amigos do mestrado, em especial Inácio, Phelipe, Heloisa, Julliana, Rodrigo, Thaís, Georgia, Elton e Helena.

Aos amigos do laboratório Luis, Orlando, seu Zeca, Fátima Regina e Eliz.

Aos companheiros do laboratório Amanda, Cynthia, Diana, Evelyne, Luis Claudio, Mari, Maira, Maria Juliana, Maria Claudia, Márcio, Nelânia, Talyce.

A Rita por toda amizade, ajuda, carinho, descontração, companheirismo, alegrias e brincadeiras.

A Carla Maciel, Pérsio, Erik pela amizade, ajuda, companheirismo, pelas alegrias e brincadeiras vividas no laboratório.

A professora Kêsia e todos do Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos.

Enfim, a todos que me fizeram acreditar que era possível, eu agradeço. Sem vocês não teria conseguido.

RESUMO GERAL

Óleo diesel é um combustível derivado do petróleo obtido a partir de processos de refino, sendo uma mistura de compostos altamente tóxicos ao meio ambiente e ao ser humano. Durante a extração, processamento, transporte e armazenamento alguns acidentes podem acontecer ocasionando danos incalculáveis aos ecossistemas. Dentre as técnicas de tratamento, a biorremediação é uma tecnologia que preconiza o uso de microrganismos ou seus produtos e processos para diminuir a poluição ambiental. Os fungos são considerados importantes organismos nos processos de biodegradação de hidrocarbonetos. A princípio, a ação combinada com outros microrganismos pode aumentar o grau de descontaminação quando comparados a utilização dos fungos isoladamente. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de fungos filamentosos para degradar óleo diesel, verificar a toxicidade dos resíduos e a produção de enzimas ligninolíticas utilizadas nos processos de biorremediação. A biodegradação foi avaliada utilizando-se concentrações crescentes, 5 a 11% da fonte oleosa. *Aspergillus terreus* se destacou na concentração de 7% quando atingiu 82,50% de degradação em um dos picos do composto oleosos. Na maior concentração de diesel a linhagem de *A. terreus* apresentou 38,49%. Para o consórcio o melhor resultado da degradação foi de 72,44% (16), porém o índice de germinação foi de apenas 1,06%. Nos ensaios enzimáticos houve uma produção de 1.944 U/L de lacase e 2.683 U/L de lignina peroxidase. Os fungos quando utilizados isoladamente apresentaram uma degradação melhor do óleo diesel do que em consórcios.

Palavras-chave: Biodegradação, fungos filamentosos, consórcio fúngico, enzimas, óleo diesel.

ABSTRACT

Diesel fuel is a fuel derived from oil obtained from the refining process, being a mixture of highly toxic chemicals to the environment and to humans. During the extraction, processing, transporting and storing some accidents can happen causing incalculable damage to ecosystems. Among the techniques of treatment, bioremediation is a technology that recommends the use of microorganisms or their products and processes to reduce environmental pollution. Fungi are important organisms in the process of biodegradation of hydrocarbons. At first the action combined with other microorganisms can increase the degree of decontamination when compared with the use of fungi alone. The aim of this study was to evaluate the potential of filamentous fungi to degrade diesel oil, check the toxicity of waste and production of ligninolytic enzymes using and enjoying the bioremediation process. The biodegradation was assessed using increasing concentrations, 5 to 11% of the oil source. *Aspergillus terreus* stood at a concentration of 7% when it reached 82.50% degradation in one of the peaks of oily compound. At the highest concentration of diesel strain of *A. terreus* had 38.49%. Consortium for the best result of the degradation was 72.44% (16), but the germination rate was only 1.06%. In enzymatic assays, there was a production of 19.44 U / L of laccase and 2.683 U / L of lignin peroxidase. Fungi when used alone showed a better degradation of diesel than in consortia.

Key-words: Biodegradation, filamentous fungi, fungal consortium, enzymes, diesel oil

Lista de figuras

Capítulo 3	Pág.
Figura 1 - Percentual de fungos capazes de descolorir o indicador DCPIP.....	34
Figura 2 - Valores de pH final para as culturas puras de <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> e <i>Penicillium commune</i> contendo concentrações crescentes de óleo diesel.....	35
Figura 3 - valores de pH final para os consórcios (planejamento experimental) de fungos contendo 7% de óleo diesel.....	35
Figura 4 - Biomassa de <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> e <i>Penicillium commune</i> em concentrações crescentes de óleo diesel.....	36
Figura 5 - Percentuais de degradação do óleo diesel na concentração de 7% pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> e <i>Penicillium commune</i>	37
Figura 6 - Percentuais de degradação do óleo diesel para o ensaio 16 do consórcio na concentração de 7%.....	37
Figura 7: Percentuais de degradação do óleo diesel para as 17 corridas (C) do consórcio na concentração de 7%.....	38
Figura 8 - Índice de Germinação (IG%) das sementes de pepino caipira crescidas com diferentes concentrações de óleo diesel para os fungos <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> e <i>Penicillium commune</i>	39
Figura 9 - Índice de Germinação (IG%) para os ensaios em consórcio com 7% de óleo diesel após cinco dias de crescimento da raiz.....	39
Figura 10 - Teste de toxicidade em sementes de pepino verde, utilizando <i>Cunninghamella echinulata</i> (a); <i>Aspergillus terreus</i> (b), <i>Penicillium commune</i> (c) na concentração de 7% de óleo diesel, após 5 dias de cultivo.....	39
Capítulo 4	
Figura 1 - Análise enzimática quantitativa da lignina peroxidase e da lacase dos ensaios do consórcio e isoladamente.....	45

Lista de tabelas

Capítulo 1	Pág.
Tabela 1 - Caracterização de óleos e derivados em função da persistência no ambiente.....	18
Tabela 2 - Principais Vazamentos de Óleo com Navios no Mundo.....	19
Tabela 3 - Principais formas de contaminação.....	20
Tabela 4 - Principais vazamentos de óleo no litoral brasileiro (1960 -2006).....	21
Capítulo 3	
Tabela 1 - Matriz codificada obtida no Planejamento experimental fatorial do Delineamento Composto Central Rotacional das três espécies selecionadas para a formação de consórcio....	33
Capítulo 4	
Tabela 1 - Matriz obtida no Planejamento experimental fatorial do tipo Delineamento Composta Central Rotacional das três espécies selecionadas para a formação de consórcio ...	43
Tabela 2 - Atividades ligninolíticas para os isolados.....	44
Tabela 3 - Atividades das enzimas lignina e lacase para os consórcios crescidos em 7% de óleo diesel.....	44

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. História dos combustíveis.....	15
2.2. Petróleo.....	15
2.3. Óleo diesel.....	16
2.4. Acidentes envolvendo o petróleo e derivados.....	18
2.5. Biorremediação como alternativa ao tratamento de locais impactados.....	22
2.6. Microrganismos degradadores.....	24
2.6.1. Produção de Enzimas por Fungos.....	25
2.6.2. Consórcio Microbiano.....	26
3. Degradação de óleo diesel por fungos filamentosos isolados e em consórcios.....	29
Resumo.....	29
Introdução.....	29
Material e métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	40
Agradecimentos.....	40
4. Produção de enzimas Lignina Peroxidase-LiP e Lacase-Lac por fungos filamentosos.....	41
Resumo.....	41
Introdução.....	41
Material e métodos.....	42
Resultados e Discussão.....	44
Conclusões.....	46
Agradecimentos.....	46
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são misturas complexas de compostos orgânicos com alto valor de energia, constituindo a principal fonte energética mundial. O óleo diesel é um dos derivados do petróleo, considerado tóxico para os seres vivos, constituído basicamente por hidrocarbonetos, que na sua grande maioria são alcanos de cadeia normal e de cadeia ramificada, e em menor proporção hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Enxofre, nitrogênio e oxigênio também podem ser encontrados no óleo diesel, porém em baixas concentrações, (PETROBRAS, 2010).

As diversas atividades como extração, produção, refino, transporte e comercialização podem apresentar riscos ambientais. Na indústria petrolífera, principalmente nas refinarias e áreas de produção, podem ocorrer vazamentos acidentais de substâncias oleosas (óleo cru e/ou seus derivados) que atingem tanto os recursos hídricos quanto os solos. Em decorrência desta realidade torna-se cada vez mais urgente a necessidade de se desenvolver e aplicar uma tecnologia eficiente de tratamento dos solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo que comporte grande carga orgânica e que envolva tempo e custos reduzidos.

Existem vários tipos de tratamento para o ambiente contaminado, como tratamentos biológicos (biorremediação), físicos (incineração, lavagem com água), químicos (solidificação/estabilização, oxidação química), e físico-químicos.

A biorremediação é uma tecnologia baseada na utilização de microrganismos ou processos biológicos para transformar os poluentes em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade, quando comparada com processos químicos e físicos, é uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos (Providenti *et al.*, 1993; Gogoi *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2003). Nas últimas décadas tem sido relatado que os fungos filamentos possuem atributos que os distinguem das outras formas microbianas nos processos de degradação, como o crescimento micelial, o qual confere uma vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis.

Segundo Bennet *et al.* (2002) a biorremediação pode utilizar três estratégias: 1) utilizar o poluente como fonte de carbono; 2) utilizar como estimulador de ataques enzimáticos, no caso de cometabolismo e 3) o bioacúmulo onde o composto não é metabolizado, mas é incorporado ao organismo. Definindo a biodegradação como a quebra de compostos químicos, que quando é completa chama-se de mineralização, resultando como produtos CO₂ e água.

Os fungos filamentosos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares. Essas enzimas são indispensáveis na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose. Estes microrganismos, aparentemente, toleram maiores concentrações de produtos tóxicos, sendo capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, com baixa atividade de água e maior do que as bactérias e leveduras (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002).

Várias vias metabólicas de degradação dos Hidrocarbonetos já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e não lignilíticos (Souza, 2009). Além da mineralização dos hidrocarbonetos, os fungos produzem compostos altamente solúveis em água, aumentando a sua reatividade química, que podem facilitar o ataque por parte de bactérias autóctones. Ressalta-se ainda, a habilidade dos fungos na degradação de substâncias recalcitrantes, sendo a utilização de consórcios fúngicos um modo de processo extremamente importante para a transformação de petroderivados em substâncias menos tóxicas ou a sua mineralização.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de fungos filamentosos na degradação de óleo diesel, verificar a toxicidade dos resíduos gerados nos processos de degradação e a produção de enzimas ligninolíticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. História dos combustíveis

Ao longo da história, a relação do homem com a natureza foi responsável por profundas transformações. O avanço da civilização resultou no desenvolvimento de vários combustíveis que marcaram a história da humanidade. Dentre os materiais mais antigos pode-se citar a madeira que foi a fonte energética mais antiga que se teve conhecimento nos tempos pré-históricos, além da lenha que era um importante instrumento e servia tanto para aquecer como para afugentar animais ferozes.

Com a Revolução Industrial, a exploração das fontes de energia sofreu uma de suas mais importantes transformações. O desenvolvimento de novas tecnologias e a produção em larga escala motivou a busca por novos combustíveis. Entre os séculos XVIII e XIX, o carvão mineral tornou-se fundamental para o funcionamento dos primeiros motores movidos a vapor. Já nos primeiros anos do século XX, a popularização dos automóveis ampliou ainda mais a demanda internacional por combustíveis de alto desempenho. Dessa forma, os combustíveis fósseis que até então eram empregados apenas para se obter o querosene, passaram a ser fonte de obtenção da gasolina. Algumas décadas mais tarde, essa mesma tendência transformou o diesel em um combustível de grande uso a partir da Segunda Guerra Mundial (Rocha *et al.*, 2002).

2.2. Petróleo

O petróleo (do latim “petrus”, pedra e “oleum”, óleo), é uma substância oleosa com cheiro característico e coloração que, pode variar desde o incolor ou castanho claro até o preto, passando por verde e marrom dependendo da matéria orgânica que o originou, sendo produzido através de processos geológicos e biológicos. Neste contexto a United Nations Environment Programme - UNEP (1991) relata que o óleo cru e o gás natural (metano) juntos são denominados petróleo.

O petróleo é a principal fonte de energia consumida no mundo, é conhecido desde longos tempos, porém sua importância cresceu com as injeções dos motores de combustão interna como os movidos a óleo diesel e gasolina, no final do século XIX, servindo também

como base para fabricação dos mais variados produtos dentre os quais se destacam benzinhas, óleo diesel, gasolina, alcatrão, polímeros plásticos e até mesmo medicamentos.

O petróleo consiste em uma mistura complexa de milhares de componentes, no estado gasoso, líquido e sólido variando de acordo com o seu tipo (Kennish, 1992). Caracteriza-se como um óleo mineral, apresentando predominantemente quatro grupos de compostos hidrocarbônicos: saturados (fração alifática), aromáticos (fração aromática), resinas e asfaltenos (Nicodem *et al.*, 2001).

A teoria mais aceita para explicar a formação do petróleo é determinada como a teoria orgânica moderna, de acordo com a qual é formado a partir de matéria orgânica incorporada às rochas sedimentares durante o processo de sedimentação (Tissot & Welte, 1984).

Nas refinarias, o petróleo passa por vários processos até a obtenção dos produtos derivados, como gasolina, diesel, lubrificantes, nafta, querosene de aviação, plásticos, tintas, além dos produtos petroquímicos (PETROBRAS, 2010).

Os hidrocarbonetos são produzidos durante a queima de combustível, incineração, processos industriais e nas refinarias de petróleo (Cheung & Kinkle, 2005).

2.3. Óleo diesel

A história da aplicação de óleos vegetais como combustível começou no final do século XIX, em 1898 na Feira Mundial de Paris, onde Rudolf Diesel apresentou um motor abastecido com óleo de amendoim mais eficiente que os motores a vapor usados na época e que devido ao baixo custo e alta disponibilidade do petróleo nessa época, este passou a ser o combustível largamente usado nestes motores. (Shay, 1993).

O óleo diesel é um derivado do petróleo que possui em sua composição átomos de hidrogênio e carbono (variando entre 8 a 38 átomos em sua cadeia), sendo que aproximadamente 40% são de n-alcanos; 39% de iso e cicloalcanos; 20% de hidrocarboneto aromáticos, e o restante é formado por isoprenoides como o enxofre, oxigênio e nitrogênio. Contudo a composição específica do óleo diesel dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação. Esse petroderivado é um material volátil, límpido, tóxico de cheiro forte sendo o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, sendo utilizado principalmente nos transportes de cargas e de passageiros (como ônibus, caminhões, furgões, navios e locomotivas). Dentre estes transportes o diesel tem sua utilização mais marcante nas máquinas agrícolas (75%), seguido das locomotivas e por fim na produção de energia com 16% e 5%, respectivamente (PETROBRAS, 2010).

Dentre os hidrocarbonetos totais que compõem o óleo diesel, incluem-se em pequenas quantidades os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como naftaleno, metilnaftaleno, dimetilnaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno e com um pouco mais de abundância os monoaromáticos (BTEX), como benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno (Mazzuco, 2004). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, são potencialmente prejudiciais para a saúde humana devido as propriedades teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas (Cai *et al.*, 2008).

A classificação de óleo diesel difere de país para país, podendo ser encontrada várias classes desse produto no mundo (Gaylarde *et al.*, 1999). O diesel brasileiro é constituído basicamente por hidrocarbonetos alifáticos, variando a cor do amarelo ao marrom, possuindo fluorescência azul, sendo produzidos dois tipos: o metropolitano (com menor teor de enxofre 0,5% no máximo) e o interior (PETROBRAS, 2010). A composição química desse composto varia quanto à distribuição de hidrocarbonetos, podendo ser classificadas em três tipos: parafas, naftalenos e aromáticos para os produtos de destilação direta, aparecendo ainda as olefinas quando o óleo diesel contém produtos de craqueamento (Campos & Epaminondas, 1989).

Apesar de os petroderivados, possuírem os mesmos compostos que o petróleo, o que caracteriza cada é o intervalo de pontos de ebulição mais restrito (National Research Council - NRC, 1985).

Os óleos de um modo geral recebem uma classificação de acordo com sua permanência no ambiente (Tabela 1). Podendo ser classificados como: não persistentes, pois tendem a desaparecer rapidamente da superfície, como exemplo deste tipo de petroderivados se pode citar a gasolina, nafta, querosene e os óleos leves. Os óleos persistentes são aqueles que se dissipam mais vagarosamente tendo como principal exemplo os óleos crus (CETESB, 2010).

Tabela 1: Caracterização de óleos e derivados em função da persistência no ambiente.

Propriedades do Petróleo	
Não Persistente	Persistente
Gasolina	
Nafta	Óleos crus
Querosene	
Óleos Leves	

Fonte: CETESB, (2010)

2.4. Acidentes envolvendo o petróleo e derivados

Com o aumento da industrialização e o crescimento da população, observa-se um aumento na geração de resíduos sólidos de origem industrial, especialmente nos grandes centros. Esse fato tem acarretado em mais uma fonte potencialmente poluidora do meio ambiente, o que inclui a contaminação do solo, subsolo, águas superficiais, subterrâneas e do ar. Nos últimos anos, em especial a década de 80, os acidentes industriais ocorridos contribuíram de forma significativa para despertar a atenção das autoridades governamentais, da indústria e da sociedade como um todo, no sentido de buscar mecanismos para a prevenção desses episódios que comprometem a segurança e a qualidade das pessoas e do meio ambiente (CETESB, 2010).

Em 1967 foi registrado o primeiro desastre ambiental mundial devido ao encalhe do petroleiro Torrey Canyon, entre a zona costeira da Inglaterra e da França, liberando 123.000 ton. de óleo, causando mortandade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo (CETESB, 2010). Em março de 1989 o acidente ocorrido com o petroleiro Exxon Valdez causou graves danos ao meio ambiente com o derramamento de onze milhões de galões de óleo bruto contaminando 563,27 Km no estado do Alasca nos Estados Unidos da América (Koren *et al.*, 2003). Como consequência do acidente, cerca de 250.000 aves marinhas e 2.800 lontras foram mortas e pode-se encontrar até a década de 90, áreas ao longo da costa atingidas pelo derramamento contaminadas com óleo debaixo da superfície. Outros acidentes como o ocorrido em Israel no ano de 1992, onde foram acidentalmente derramadas aproximadamente 100 toneladas de óleo bruto (Grawford & Grawford, 1996).

As últimas décadas também têm sido marcadas por graves acidentes envolvendo petroleiros e plataformas como o ocorrido com o navio Prestige que afundou na Espanha no

final de 2002 derramando 20,5 milhões de galões de hidrocarbonetos causando um grande impacto ambiental (Drago, 2010).

Na tabela 2 podem-se visualizar os principais acidentes registrados que ocorreram no mundo ao longo do tempo.

Tabela 2: Principais Vazamentos de Óleo com Navios no Mundo

Posição	Nome do navio	Ano	Local	Vazamento de óleo (Ton.)
1	Atlantic Empress	1979	Off Tobago, West Indies	287,000
2	ABT Summer	1991	700 milhas náuticas de Angola	260,000
3	Castillo de Bellver	1983	Baía Saldanha, South Africa	252,000
4	Amoco Cadiz	1978	Off Brittany, France	223,000
5	Haven	1991	Genova, Italia	144,000
6	Odyssey	1988	700 milhas nauticas de Nova Scotia, Canada	132,000
7	Torrey Canyon	1967	Ilhas Scilly, UK	119,000
8	Sea Star	1972	Golfo de Oman	115,000
9	Irenes Serenade	1980	Baía de Navarino, Grecia	100,000
10	Urquiola	1976	La Coruna, Espanha	100,000
11	Hawaiian Patriot	1977	300 milhas nauticas de Honolulu	95,000
12	Independenta	1979	Bosphorus, Turquia	95,000
13	Jakob Maersk	1975	Porto, Portugal	88,000
14	Braer	1993	Ilhas Shetland, UK	85,000
15	Khark 5	1989	120 nautical miles off Atlantic coast of Morocco	80,000
16	Aegean Sea	1992	La Coruna, Espanha	74,000
17	Sea Empress	1996	Milford Haven, UK	72,000
18	Nova	1985	Ilhas Kharg , Golfo do Iran	70,000
19	Katina P	1992	Maputo, Moçambique	66,700
20	Prestige	2002	Galicia, Espanha	63,000
21	Exxon Valdez	1989	Prince William Sound, Alaska, USA	37,000

Fonte: ITOPF - INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION (2010)

Segundo relatório emitido pela CETESB (2010) as refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de rejeitos indesejáveis que poluem o meio ambiente sendo os principais poluidores do solo e dos mananciais de água. As fontes desse produto são provenientes, principalmente, dos fundos de tanques-reservatórios dos navios petroleiros das unidades de tratamento e do armazenamento (Tabela 3). As regiões costeiras são as mais susceptíveis aos derramamentos de petróleo e seus derivados uma vez que é nessa região onde ocorrem as operações realizadas nos portos (Silva, 2004). A poluição ambiental causada pela liberação de hidrocarbonetos, decorrentes das atividades industriais e de derramamentos acidentais de

petróleo e seus derivados, pode causar uma série de impactos sobre os organismos e ecossistemas marinhos e terrestres (Pirôllo, 2006).

Tabela 3: Principais formas de contaminação.

Atividades	Percentuais (%)
Armazenamento	2,71
Descarte	4,16
Indústria	7,01
Mancha Órfã	1,05
Nada Constatado	5,36
Não Identificada	9,77
Outras	11,35
Postos e Sistemas Retalhistas de Combustíveis	8,53
Transporte Ferroviário	1,19
Transporte Marítimo	4,58
Transporte por Duto	2,59
Transporte Rodoviário	41,69

Fonte: CETESB, 2010

No Brasil um dos primeiros casos de vazamento de petróleo registrado foi o ocorrido no Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, em 1955, durante o transbordo de petróleo de navios maiores para menores. Porém, o primeiro grande derrame notificado ocorreu em 1974, quando o petroleiro *Takimyia Maru* chocou-se contra uma rocha no Canal de São Sebastião, causando vazamento aproximado de 6.000 ton. de petróleo, *Tarik Ibn Ziyad* (1975) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro e o *Brazilian Marina* (1978), também em São Sebastião. No entanto, a ocorrência de maior repercussão na mídia, devido ao impacto socioambiental gerado, foi o rompimento do oleoduto na Baía da Guanabara (2000), com vazamento de 1,3 ton. (Poffo, 2000; CETESB, 2010).

De janeiro de 1978 a dezembro de 2006, 6.700 ocorrências foram registradas no Estado de São Paulo. Dentro desse panorama, o que se observa é um crescente número de casos até janeiro de 2001, totalizando 626 e a partir de então uma diminuição até o ano de

2005 quando se atingiu um total de 397 casos por ano. A maioria destes casos ocorreu em São Paulo no litoral norte e na baixada santista, onde se concentram o maior número de atividades envolvendo a manipulação e o transporte de substâncias oleosas por transporte marítimo, dutos e terminais de armazenamento entre outras fontes (Tabela 4) (CETESB, 2010).

Tabela 4 - Principais vazamentos de óleo no litoral brasileiro (1960 -2006)

Fonte/Causa	Data	Local / áreas atingidas	Vol. Vazado m³
N/T Sinclair Petrolore desconhecida	dez/1960	Costa brasileira/ desconhecido	66.530
N/T Takamyia Maru acidente de navegação	ago/1974	São Sebastião (SP)/ praias e costões/ Ubatuba	6.000
N/T Tarik Ibn Ziyad acidente de navegação	mar/1975	Baía de Guanabara (RJ) praias e costões,	6.000
N/T Brazilian Marina acidente de navegação	jan/1978	São Sebastião (SP) praias e costões	6.000
Oleoduto / Vila Socó rompimento	fev/1984	Cubatão (SP) mangue e vila: mortos / feridos	1.200
Barcaça Gisela adernamento	Set/1984	Alemoa/Santos (SP) manguezal/Porto de Santos	420
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão rompimento	nov/1983	Bertioga (SP) mangue, praias e costões	2.500
N/T Marina acidente de navegação	mar/1985	São Sebastião (SP) praias e costões / 4 municipios	2.000
N/T Penelope acidente de navegação	mai/1991	São Sebastião (SP) praias, costões, marisma	280
N/T Theomana não apurada	set/1991	Bacia de Campos (RJ) mar aberto	2.150
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão rompimento	mai/1994	São Sebastião (SP) praias e costões	2.700
Oleoduto REDUC / Ilha d'Água rompimento	mar/1997	Baía da Guanabara (RJ) mangue	2.700
N/M Smyrni acidente de navegação	jul/1998	Santos (SP) mangue, praias e costões	40
N/T Maruim fissura no casco	ago/1998	São Sebastião (SP) praias, costões e marisma	15
Refinaria de Manaus	ago/1999	Manaus (AM)	~ 1

		Rio Negro	
Campo de Produção	nov/1999	Carmópolis (SE) mar e pesca	Não estimada
Oleoduto REDUC / Ilha d'Água rompimento	jan/2000	Baía da Guanabara (RJ) mangue, praias e costões	1.300
Transporte marítimo	mar/2000	Tramandaí (RS) mar e praia	18
Oleoduto Rompimento	jul/2000	Rios Iguazu e Barigui (PR)	~ 4.000
N/T Vergina acidente de navegação	nov/2000	São Sebastião (SP) praias, costões, marisma, mangue	86
Plataforma P 36	mar/2001	Bacia de Campos (RJ) mar aberto	1.500
Plataforma P 7	abril/2001	Bacia de Campos (RJ) mar aberto	124
Navio Norma - nafta acidente de navegação	out/2001	Baía de Paranaguá (PR)	5.000
Oleoduto S. Sebastião - Cubatão rompimento	fev/2004	São Sebastião (SP) rio, vegetação, praia Guaecá	~ 235
Navio Vicuña explosão	nov/2004	Baía de Paranaguá (PR) mangue, marisma, praia, costão	1000m ³ metanol 5.000 óleo

Fonte: CETESB, (2010)

2.5. Biorremediação como alternativa ao tratamento de locais impactados

Ao ocorrer um vazamento, diversos mecanismos são usados para remover a maior quantidade de óleo do ambiente, porém, em alguns casos, como incineração e aterro, o tratamento físico-químico apresenta um custo elevado. Portanto, os tratamentos biológicos surgiram como uma alternativa "verde" para tratar estes contaminantes ambientais (Paixão *et al.*, 2007). A biorremediação é uma tecnologia alternativa baseada na utilização de microrganismos ou processos biológicos para transformar os poluentes em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade. Quando comparada com processos químicos e físicos, é uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes

orgânicos (Providenti *et al.* 1993; Gogoi *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2003). A capacidade que certos microrganismos possuem em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono foi proposta por Zobell em 1946, o qual observou que, os microrganismos estão amplamente difundidos na natureza e que a origem do óleo e as condições ambientais são altamente importantes em seu comportamento (Bento *et al.*, 2005).

Em 1995, Atlas afirma que biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas em que se utilizam microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes.

A capacidade dos microrganismos em degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico. Graças a essa habilidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais se destacam a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados - solo, águas superficiais e subterrâneas (Oliveira, 2002). Tais microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes.

Cunha (1996) descreve que a biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. O benefício máximo desse processo é a mineralização, obtendo como produto final CO₂ e água. Lemos (2001), afirma que a degradação incompleta produz o rompimento de compostos que podem ou não ser menos tóxicos que os contaminantes originais.

Cammarota & Freire (2006) afirmam que a biorremediação caracteriza-se por ser uma tecnologia limpa permitindo a recuperação de locais contaminados através estimulação de crescimento de microrganismos capazes de degradar o óleo, convertendo substâncias complexas em moléculas mais simples, promovendo assim a degradação.

A biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos através de microrganismos tem sido considerada como uma forma eficiente, versátil e econômica de tratamento de ambientes impactados. Para isso é possível fazer uso de tratamentos *in situ* e *ex-situ* (Margesin & Schinner, 2001). Segundo Melo & Azevedo (2008) esses tipos de tratamento dependem do local de onde ocorre o processo de biorremediação, podendo ser classificado como:

in situ: o tratamento ocorre no local da contaminação.

ex-situ: o solo é retirado e tratado noutro local.

on site: tratamento no local após escavação do solo.

off-site: tratamento fora do local após escavação do solo.

2.6. Microrganismos degradadores

Os hidrocarbonetos, presentes em um ambiente contaminado, são geralmente degradados por microrganismos como bactéria e fungos, porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do ambiente contaminado (Cunha, 1996). Os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade (Macedo *et al*, 2002).

Os microrganismos utilizam as mesmas vias metabólicas, normalmente destinadas ao seu crescimento e obtenção de energia, para a degradação de moléculas contaminantes. Esse fenômeno é conhecido como cometabolismo (Alef & Nannipieri, 1995).

Bennet *et al.* (2002) afirmam que a recuperação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos envolve a utilização de algumas espécies de fungos. Muitos desses apresentam capacidade em degradar xenobiótico e absorver metais.

Os microrganismos são considerados os principais biodegradadores devido a sua abundância, diversidade, versatilidade catabólica e anabólica, além de uma capacidade de adaptação as condições adversas do meio onde se encontram (Jorgensen *et al.*, 2000; Mishra, 2001).

Muitos microrganismos utilizam os hidrocarbonetos como única fonte de carbono e necessitam de condições ambientais para o seu crescimento. Por sua vez, a velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de, pelo menos, quatro fatores principais (Atlas, 1981; Rodrigues, 1984; Baird, 2002).

I- Umidade, para facilitar as reações;

II- Oxigênio, para rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo, sob condições anaeróbicas, a biodegradação é mais lenta e normalmente efetuada por bactérias sulfato-redutoras;

III- Contato óleo-água, devido à relativa insolubilidade do óleo na água, tal contato controla a velocidade de oxidação e da degradação;

IV- Presença de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos, etc) para o desenvolvimento microbiano.

Os fungos são os organismos mais importantes na biodegradação de hidrocarbonetos presentes em solos (Jones & Eddington, 1968; Rosato, 1997). Em geral, as bactérias e leveduras apresentam capacidade decrescente de degradação de acordo com o aumento da cadeia carbônica ao passo que os fungos não exibem degradação preferencial em relação ao tamanho da cadeia (Walker *et al.*, 1975). Nas últimas décadas tem sido relatado que os fungos filamentosos possuem atributos que os distinguem das outras formas microbianas nos processos de degradação, como o crescimento micelial, o qual confere uma vantagem sobre as células unicelulares, de bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002).

Os fungos desempenham um importante papel na manutenção ambiental, na natureza estão envolvidos no processo de biorremediação de vários poluentes como metais, pesticidas e organoclorados, hidrocarbonetos dentre outros (Esposito & Azevedo, 2004). Os fungos filamentosos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares. Essas enzimas são indispensáveis na degradação dos componentes dos substratos. Estes microrganismos, em comparação com as bactérias e leveduras, aparentemente, toleram maiores concentrações de produtos tóxicos, são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, com baixa atividade de água (Velázquez-Cedeño *et al.*, 2002).

2.6.1 Produção de enzimas por fungos

Enzimas são biocatalizadores utilizados nas indústrias podendo ser empregado na biologia molecular e aplicações biomédicas (Sanchez & Deman, 2002), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (Chirumamilla, 2001).

Há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usado em muitos processos de remediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes. As potenciais vantagens do tratamento enzimático, em comparação com os tratamentos convencionais incluem: aplicação dos materiais recalcitrantes; a operação em altas e baixas concentrações de contaminantes ao longo de uma ampla faixa de pH, de temperatura e salinidade; as necessidades de aclimatação da biomassa e do processo de controle mais fácil; entre outros (Duran & Esposito, 2000).

Os microrganismos possuem um grande potencial de geração de produtos naturais e de transformações de substâncias, como nos processos de biodegradação (Silva, 2009). Então, a pesquisa de enzimas extracelulares produzidas por fungos é muito importante, principalmente as do sistema ligninolítico, pois participam na recuperação ambiental, processo no qual os sistemas biológicos são utilizados para diminuir ou neutralizar poluentes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que representam risco à saúde por causa de seus efeitos biológicos prejudiciais (Lopez *et al.*, 2007; Arun *et al.*, 2008).

Lignina peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14) e lacase (Lac) (E.C:1.10.3.2) são as duas enzimas mais importantes nos processos de degradação de lignina com uma larga aplicação nas indústrias (D'Souza *et al.*, 2006). Além disso, estas enzimas têm um alto potencial em um largo número de campos, incluindo os químicos, combustíveis, alimentos, papel, agrícolas, têxteis, cosméticos e setores industriais (Sette *et al.*, 2008). A lacase é uma enzima que contém cobre em seu sítio ativo, no entanto lignina peroxidase (LiP) contém ferro como grupo prostético. A lignina peroxidase é uma proteína heme com um elevado potencial de oxidação e pode oxidar substratos fenólicos e não fenólicos. A lacase é uma oxidase que catalisa a redução do O₂ a H₂O e oxida aminas aromáticas (D'Souza *et al.*, 2006)

Diferentes grupos de fungos têm sido descritos como produtores de enzimas lignolíticas (Gianfreda & Rao, 2004; Cullen, 1997). A produção dessas enzimas é frequentemente sintetizada durante o metabolismo secundário dos fungos, porém em diferentes meios de cultivo os fungos podem produzir diferentes enzimas (Gianfreda *et al.*, 1999; Nyanhongo *et al.*, 2002).

2.6.2 Consórcio microbiano

Poucos são os trabalhos com consórcios somente de fungos, são mais frequentes os consórcios mistos de espécies de bactérias, ou de várias espécies de bactérias com dois ou três fungos. Kataoka (2001) afirma que devido a uma grande dificuldade de análises de misturas complexas, a maioria dos trabalhos realizados sobre microrganismos que degradam hidrocarbonetos têm sido realizados envolvendo o crescimento de um único microrganismo sobre um único hidrocarboneto ou uma classe de hidrocarbonetos relacionados.

Uyttebroek *et al.* (2007) afirmam que a ação combinada de microrganismos podem degradar em grau maior do que qualquer um deles sozinho. Fungos e bactérias são capazes de degradar parcialmente ou completamente hidrocarbonetos por cometabolismo, ou quando os

produtos de sua degradação estão presentes, como mostrado com microrganismos isolados individuais ou por consórcios microbianos (Boonchan *et al.*, 2000; Kotterman *et al.*, 1998).

Os consórcios microbianos mistos de bactérias e fungos são considerados mais promissores para degradação de hidrocarbonetos em comparação as culturas puras, esses consórcios têm sido mais eficazes devido à especificidade enzimática de cada um dos microrganismos, resultando maiores taxas de degradação e mineralização (Boonchan *et al.*, 2000; Kohlmeier *et al.*, 2005; Wick *et al.*, 2007).

Kataoka (2001) afirma que em uma cultura mista o produto metabólico pode ser degradado só por uma única espécie, sendo que o ataque de outros microrganismos leva a uma completa degradação do composto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo completamente.

Das várias técnicas disponíveis para a remoção de fenóis do ambiente, biodegradação é uma técnica amigável e de baixo custo e tem sido extensivamente estudada usando culturas pura e mistas (Agarry *et al.*, 2008; Reardon *et al.*, 2000).

A interação entre diferentes microrganismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (Fernandez-Sanchez, 2001). Boonchan *et al.* (2000) constataram que a inoculação de consórcios microbianos pode melhorar significativamente a degradação de compostos tóxicos em solos contaminados.

Ururahy *et al.* (1998) afirmam que vários tipos de microrganismos individualmente, metabolizam um limitado número de hidrocarbonetos, e que na biodegradação de hidrocarbonetos complexos, é necessária a cooperação entre espécies distintas de microrganismos para a completa mineralização dos compostos do petróleo em gás carbônico e água ou gás metano e água.

A incapacidade de isolar um único microrganismo capaz de crescer em ambiente contaminado por hidrocarbonetos sugere que a mineralização dos compostos na natureza depende em grande parte da cooperativa atividades metabólicas da mistura de populações microbianas (Boonchan *et al.*, 2000). Os organismos podem metabolizar somente um número limitado de hidrocarbonetos isoladamente, de forma que é requerida uma mistura de populações com capacidade enzimática para degradar todos os hidrocarbonetos encontrados no petróleo (Souza, 2009).

Os consórcios de microrganismos apresentam atividades enzimáticas relacionadas à degradação de substâncias xenobióticas. Nos processos aeróbicos, o oxigênio é requerido para

o processo de biodegradação, envolvendo o catabolismo dos hidrocarbonetos por ação de oxidases (Ghazali, 2004).

Mariano (2006) afirma a importância de do cometabolismo no tratamento de poluentes realcitantes como o óleo diesel, uma vez que cada espécie tem uma função específica nas seqüências reações enzimáticas, reações estas responsáveis pela quebra de cadeias complexas de hidrocarbonetos.

Os consórcios de microrganismos apresentam atividades enzimáticas relacionadas à degradação de substâncias xenobióticas. Nos processos aeróbicos, o oxigênio é requerido para o processo de biodegradação, envolvendo o catabolismo dos hidrocarbonetos por ação de oxidases (Ghazali, 2004).

3. DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADAMENTE EM CONSÓRCIOS

Arruda F.V.F., Almeida A.C., Miranda R. M., Maciel C. C.S., Silva P. A, Melo E. J. V., Gouveia E. R, Gusmão, N. B.

Resumo

O óleo diesel é um derivado do petróleo com um alto potencial tóxico, sua manipulação e transporte têm ocasionado vários acidentes aos ecossistemas. Para isso diversas técnicas vêm sendo utilizadas para minimizar a ação deste poluente nos ambientes, dentre elas a biorremediação que utiliza microrganismos ou processos biológicos para reduzir ou eliminar os poluentes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de fungos filamentosos em degradar óleo diesel em concentrações de 5 a 11% v/v. Foram utilizados 14 fungos isolados de sedimentos impactados com petróleo e selecionados quanto ao seu potencial de degradação. Os fungos foram submetidos a ensaios de aclimatação em concentrações crescentes de 5 até 11% de óleo diesel. Após esse experimento três fungos foram selecionados para a realização do consórcio. Ao final de cada ensaio (culturas puras e em consórcio), alíquotas foram retiradas para as determinações de pH, biomassa total, taxas de degradação, toxicidade dos subprodutos. *Aspergillus terreus* apresentou 82,50% de degradação em 7% de óleo diesel, 4,1 de pH; 0,09g/L de biomassa e um índice de germinação das sementes de 45,88% enquanto que o melhor consórcio, corrida 16, atingiu 72,44% de degradação, 6,95 de pH, 0,02g/L de biomassa e com índice de germinação das sementes de 7,57%. Os fungos em culturas puras apresentaram melhor percentual de degradação do óleo diesel do que quando em consórcios.

Palavras chaves: Degradação, Óleo Diesel, Fungos, Consórcio, Toxicidade.

1. Introdução

O óleo diesel é um derivado do petróleo composto por átomos de hidrogênio e carbono. Dependendo do local de origem do petróleo essa composição pode variar. O diesel brasileiro é constituído basicamente por hidrocarbonetos alifáticos, sendo produzidos três tipos: A – utilizado em motores diesel e instalações de aquecimento de pequeno porte; B, o metropolitano é também utilizado para aplicação automotiva e difere do tipo A, por possuir menor teor de enxofre, consumido em regiões metropolitanas de Porto Alegre, Curitiba, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Salvador, Recife, Fortaleza e Aracaju que necessitam de um óleo com menor emissão e que produza ganho ambiental, e ao final o tipo D é chamado de diesel marítimo, por ser produzido especialmente para utilização em motores de

embarcação marítima. Difere do diesel Tipo A por apresentar o seu ponto de fulgor no mínimo a 60 °C (PETROBRAS, 2010).

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis que poluem o meio ambiente sendo os principais poluidores do solo e dos mananciais de água. A poluição ambiental pode causar uma série de impactos sobre os organismos e ecossistemas marinhos e terrestres (Piróllo, 2006).

Tratamentos biológicos surgiram como uma alternativa "verde" para tratar estes contaminantes ambientais (Paixão *et al.*, 2007). A biorremediação é uma tecnologia alternativa baseada na utilização de microrganismos ou processos biológicos para transformar os poluentes em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade (Gogoi *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2003).

Consórcio significa a comunhão de interesse, a associação entre diferentes organismos. A interação entre diferentes microrganismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como os hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (Fernandez-Sanchez *et al.*, 2001). Portanto este trabalho objetiva a avaliação do potencial de degradação de óleo diesel por fungos filamentosos isoladamente e em consórcio.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos e condições de cultivo

As espécies utilizadas nos experimentos foram: *Aspergillus parasiticus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. terreus*, *A. tamarii*, *Cunninghamella echinulata*, *Curvularia pallescens*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. commune*, *P. waksmanii*, *P. duclauxi*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Talaromyces flavus*. Estes fungos foram previamente isolados do sedimento de manguezal no Recôncavo Baiano e mantidos na Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os fungos foram mantidos no meio ágar Sabouraud.

O pH do meio de cultivo de cada ensaio realizado foi medido em potenciômetro da marca PHTEK modelo PHS-3B. A determinação da biomassa microbiana foi realizada por gravimetria.

2.2. Seleção dos Fungos com potencial em degradar petroderivados

Os fungos filamentosos foram selecionados quanto ao seu potencial de degradação segundo a metodologia de Hanson *et al.* (1993). Esse ensaio foi realizado em placas multipoços (24 poços). Em cada poço foi acrescentado 1,25 mL do meio Bushnell Haas - BH, (1g de KH_2PO_4 ; 1g de K_2HPO_4 ; 1g de NH_4NO_3 ; 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g de FeCl_3 ; 0,02g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para 1000 mL solução salina 0,9%); 200 μL de suspensão microbiana, padronizada em 9×10^8 esporos mL^{-1} ; 50 μL de óleo diesel (1%, 3%, e 5%); 75 μL do indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol DCPIP.

2.3. Ensaios em concentrações crescentes de óleo diesel

Os três fungos selecionados, foram submetidos a ensaios de aclimatação em concentrações crescentes de 5 até 11% de óleo diesel com pH inicial de 7. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 100 mL do meio BH, mais 10% (v/v) do inóculo, contendo três blocos gelose (\varnothing 6mm) com fungos previamente crescidos e óleo diesel. O ensaio foi mantido a de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), em condição estática, por um período de até 5 dias. Ao final de cada ensaio, alíquotas foram retiradas (10 mL) para serem realizada as análises cromatográficas, testes de toxicidade e medição do pH e biomassa.

2.4. Teste de toxicidade dos subprodutos do óleo diesel

Este procedimento foi conduzido empregando-se sementes de pepino caipira – (*Cucumis sativus* L.) de acordo com a metodologia proposta por Tiquia *et al.* (1996). As sementes (10 unidades) foram colocadas em placas de Petri previamente forradas com papel de filtro duplo embebido em 2 mL do resíduo do cultivo, este procedimento foi realizado em triplicata. As placas ficaram incubadas ($\pm 28^\circ\text{C}$) por 5 dias.

Dois controles foram utilizados, um positivo com água destilada e o outro negativo com óleo diesel. Após o período de incubação, calculou-se a porcentagem e o índice de germinação das sementes segundo a fórmula: porcentagem relativa de germinação (%G) = (Média de sementes germinada) \div (Média da semente germinadas no controle) x 100; crescimento médio da raiz (%CMR) = (Média do crescimento da raiz) \div (Média de crescimento da raiz do controle) x 100, a fim de calcular o índice de germinação (%IG), %IG = (% Germinação da semente) x (% Crescimento da raiz) \div 100.

2.5. Extração e análise residual dos subprodutos do óleo diesel

A avaliação da biodegradabilidade de cada composto que constitui o óleo diesel foi realizada por comparação entre os picos dos compostos encontrados no controle com os dos ensaios seguindo a metodologia de Miranda *et al.* (2007). As alíquotas retiradas de cada ensaio, anterior, foram extraídas (três vezes) com diclorometano e em seguida as fase separadas em funil de separação e posteriormente injetado no cromatógrafo fase gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG-MS).

Nesse ensaio o cromatográfico utilizado foi o modelo ShimadzuTM 17A/QP 5050A com temperatura de injeção e de interface de 290°C, utilizando uma coluna cromatográfica OV-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30m x 0,25 µm.

O volume injetado foi de 1 µL, com split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mLmin⁻¹ e a temperatura programada para variar linearmente de 40°C a cada 4 minutos, a 290°C por 8 minutos com taxa de aquecimento de 4°C min⁻¹.

O espectrofotômetro de massa com ionização elétrica e detector do tipo Multiplicador Secundário de Elétrons (70EV) operou com temperatura de fonte de íons de 290°C e varredura de 35m/z a 500m/z. A identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada por comparação dos espectros de massa dos compostos do óleo diesel com os da Biblioteca de Compostos Wileytm.

2.6. Consórcio microbiano

Para a elaboração do consórcio fúngico foi realizado um planejamento experimental fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios com o auxílio do software STATISC 6.0, onde os pontos axiais correspondem a 2 (-1), 3 (0) e 4 (+1) blocos de gelose, de cada fungo e com valor mínimo de 1(-1,68) e máximo de 5 (1,68) blocos de gelose (Tabela 1). Os fungos consorciados foram submetidos a ensaio de aclimação, como descrito anteriormente, onde foram avaliados os parâmetros pH, biomassa, toxicidade e biodegradabilidade dos compostos do óleo diesel.

Tabela 1. Matriz codificada obtida no Planejamento Experimental Fatorial do tipo Delineamento Composta Central Rotacional das três espécies selecionadas para a formação de consórcio

Corrida	Fungo 1	Fungo 2	Fungo 3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

3. Resultados e Discussão

Das linhagens testadas, 30% mostraram potencial em degradar óleo diesel e 70% não descoloriu como pode ser observado na Figura 1. Os melhores resultados da mudança de coloração do indicador DCPIP foi observado com menos de 24 horas quando *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* foram utilizados na menor concentração de esporos, indicando que possuem capacidade de metabolizar o óleo diesel. Em até 48 horas, para a menor concentração de esporos, *Aspergillus parasiticus* e *A. terreus*, apresentaram melhores resultados, e após 72 horas, *Trichoderma longbrachiatum*, *A. oryzae* e *A. terreus*.

Para a maior concentração de esporos em um intervalo de tempo de até 24 horas, *C. echinulata* e *P. commune* apresentaram melhores resultados seguidos de *A. terreus*, para até 48 horas. Chaillan *et al.* (2004), durante um período de 30 dias, selecionaram oito bactérias, 21 fungos filamentosos e quatro leveduras com potencial em degradar óleo diesel. Miranda *et al.* (2007), utilizando a mesma metodologia de seleção empregada neste trabalho,

selecionaram duas linhagens de leveduras capazes de degradar óleo diesel entre 16 e 24 horas, assim como Souza (2008), selecionaram dois fungos que descoloriram o meio contendo óleo diesel com 72 horas.

Para os ensaios de degradação foram selecionados *A. terreus*, *C. echinulata* e *P. commune*.

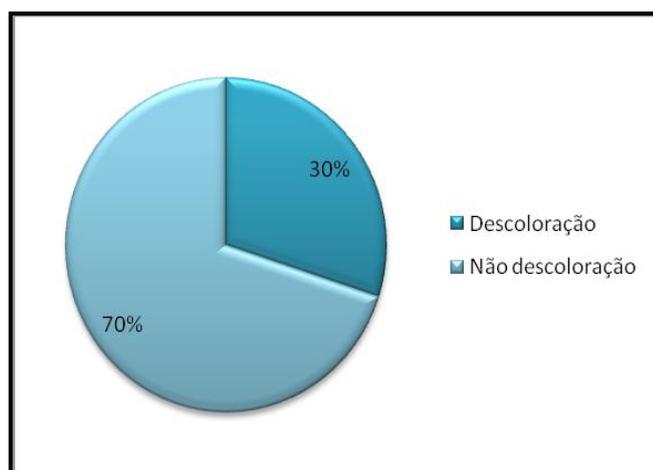


Figura 1: Percentual de fungos capazes de descolorir o indicador DCPIP.

Das concentrações de óleo diesel testadas, os microrganismos cresceram até a concentração de 9%, com 11% ocorreu diminuição do valor de biomassa. Chaillan *et al.* (2004) afirmam que vários microrganismos, incluindo fungos filamentosos, são capazes de degradar hidrocarbonetos. Houve um decréscimo do valor do pH a partir da concentração de 5%, permanecendo assim durante todo o ensaio (Figura 2).

O valor mais baixo de pH (4,1) foi verificado para *A. terreus* na concentração de 7%. Aislabe *et al.* (2006) afirmam que ácidos orgânicos, podem acumular-se durante a biodegradação, portanto uma queda do pH, pode indicar que houve uma maior atividade microbiana. Para todos os 17 ensaios em consórcio o pH mostrou-se próximo da neutralidade (Figura 3).

Mariano (2006), trabalhando com biorremediação de óleo diesel, utilizando bactérias e consórcios de microrganismos obtidos de solo e água subterrânea, observou que o pH manteve-se neutro e estável em todos os tratamentos.

É possível observar nos resultados (Fig. 2 e Fig. 3) que nos ensaios com *C. echinulata* e *A. terreus* quando cultivados isoladamente o pH foi abaixo de 6, entretanto quando em consórcios o pH final esteve próximo da neutralidade.

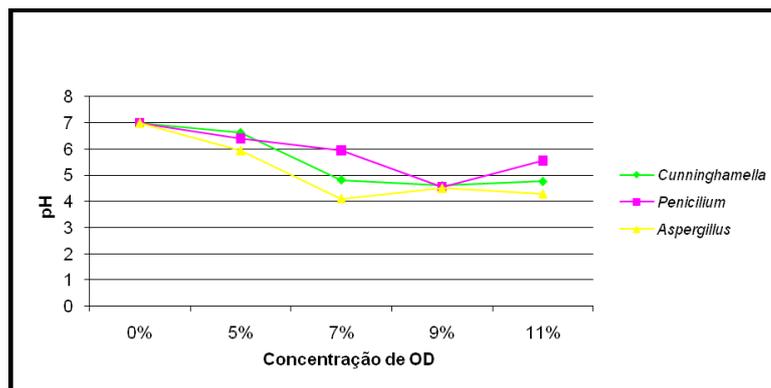


Figura 2: Valores de pH final para as culturas puras de *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* contendo concentrações crescentes de óleo diesel (OD).

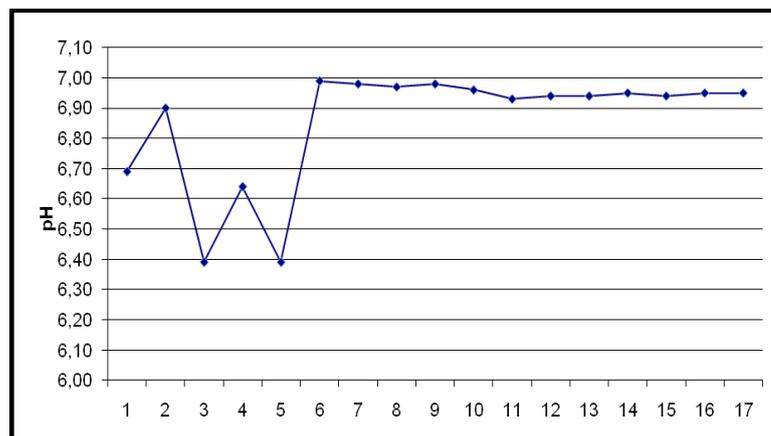


Figura 3: Valores de pH final para os consórcios (planejamento experimental) de fungos contendo 7% de óleo diesel.

Preconiza-se que para processos de biorremediação o ideal é que se tenham pouca geração de biomassa e boas taxas de degradação. Neste trabalho é possível observar que *P. commune* apresentou menor biomassa na concentração de 5% e a maior a 9%, seguido de *A. terreus* na concentração de 7%. A biomassa dos ensaios em consórcios ficou entre 0,0012 a 0,0768 g/L, (Figura 4).

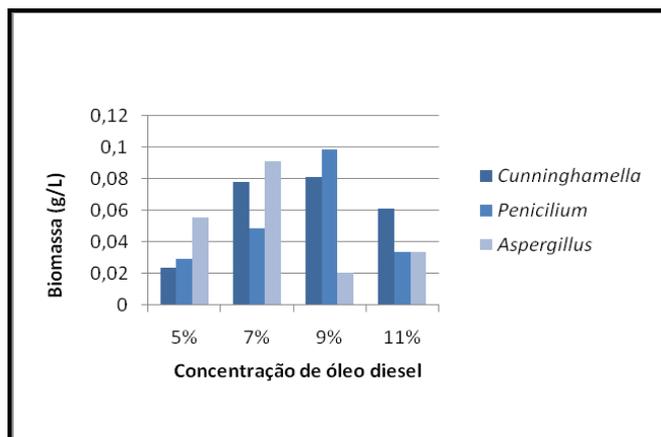


Figura 4: Biomassa de *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* em concentrações crescentes de óleo diesel.

3.2. Ensaio de degradação do óleo diesel

Dentre os hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, 13 hidrocarbonetos do composto são os mais representativos. Para os ensaios com os fungos isoladamente *A. terreus*, na concentração de 7%, apresentou as melhores taxas de degradação de 82,50% do nonano e 77% de decano (Figura 5), enquanto que *P. commune* demonstrou mais eficaz na degradação dos outros compostos, com taxas superiores a 70%.

Souza (2008) utilizando a mesma metodologia descrita neste trabalho avaliou a degradação de óleo diesel, em uma concentração de 12%, por quatro fungos isoladamente, observando uma degradação acima de 55% de tais compostos por apenas uma linhagem de *Trichosporon pullulans*.

Bento *et al.* (2005) após duas semanas de experimentos utilizando técnicas de bioestimulação e o bioaumento, utilizando bactérias e consórcios microbiana obtidos a partir do solo e de águas subterrâneas, constatou uma degradação de em torno de 50% dos compostos presentes em petróleo.

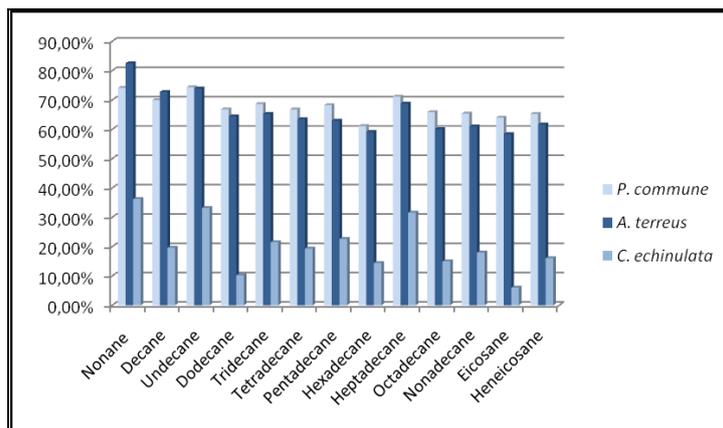


Figura 5: Percentuais de degradação do óleo diesel na concentração de 7% por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.

Os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa do que os de estrutura simples e mais curta. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (Riser-Roberts, 1992).

Dentre os ensaios em consórcio a maior biodegradabilidade pode ser observada no ensaio 16, utilizando 3 blocos de gelose de cada microrganismo, quando degradou 72,44% do nonano presente na fonte oleosa na concentração de 7%. Foi realizado um teste de antagonismo em meio Agar Sabouraud, mostrando que houve interação entre os três fungos, pois foi possível observar o crescimento dos três organismos testados, porém, com os resultados do consórcio foi possível verificar que diante da fonte oleosa, em outras condições de cultivo (consórcio) as interações entre os fungos não foram tão eficientes.

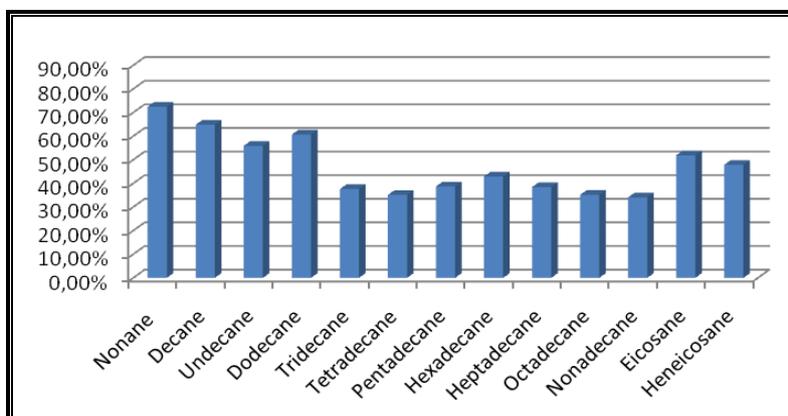


Figura 6: Percentuais de degradação do óleo diesel para o ensaio 16 do consórcio na concentração de 7%.

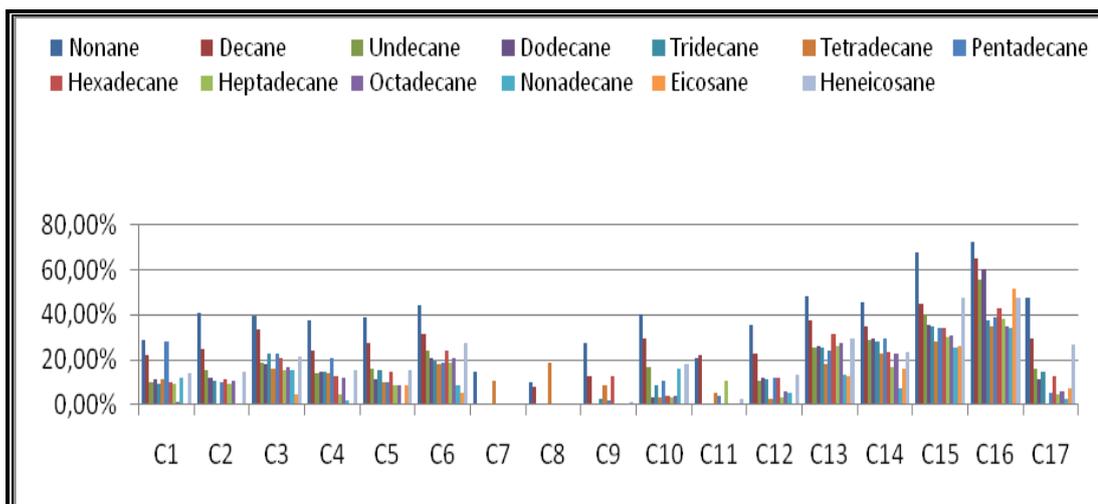


Figura 7: Percentuais de degradação do óleo diesel para as 17 corridas (C) do consórcio na concentração de 7%.

Os tratamentos biológicos utilizando microrganismos vêm sendo apresentado como uma poderosa alternativa biotecnológica, apresentando-se uma técnica viável na recuperação de áreas poluídas (Kunz *et al.*, 2002).

Pode-se observar que os fungos 1 e 2 não apresentaram degradação significativamente diferentes. Entretanto ao se fazer o mesmo tratamento acrescentando o fungo 3, a degradação foi significativamente diferente.

3.3. Teste de toxicidade dos subprodutos do óleo diesel

Para o teste de toxicidade observou-se que nas concentrações de 5% e 7% os resultados foram satisfatórios, porém nas concentrações de 9% e 11% a toxicidade do resíduo mostrou-se alta. Para a menor concentração de óleo diesel, *A. terreus* e *P. commune* apresentaram índice de germinação superior a 70%. Na maior concentração *C. echinulata* apresentou melhor resultado com 45,72%, enquanto *A. terreus* apresentou 38,49%. Nas concentrações intermediárias (7% e 9%) o índice de germinação variou entre 13 e 57% para os fungos testados (figura 9). Para os ensaios em consórcios o resíduo mostrou-se tóxico apresentando taxas inferiores a 25% de índice de germinação como o mostrado na figura 10.

A fitotoxicidade em vegetais tem sido estudada devido à presença de poluentes no solo. Pesquisas realizadas com grãos de milho e feijão indicam que a fitotoxicidade aumenta em solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos (Baek *et al.*, 2004). Rivera-Cruz &

Trujillo-Narcia, (2004) afirmam que a inibição da germinação e a diminuição do crescimento vegetal assim como a morte das plantas são indicadores da toxicidade de poluentes.

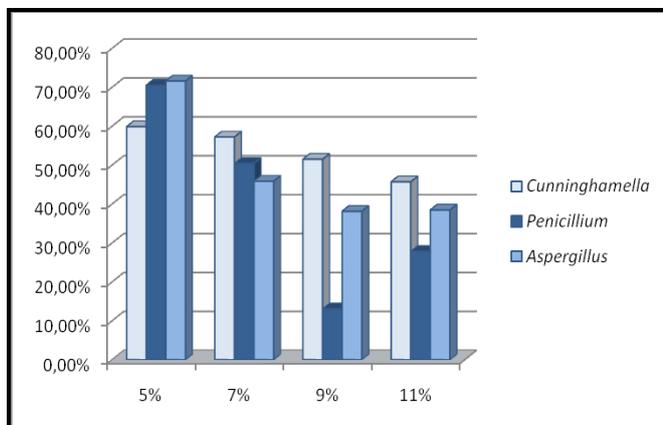


Figura 8: Índice de Germinação (IG%) das sementes de pepino caipira crescidas com diferentes concentrações de óleo diesel para *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.

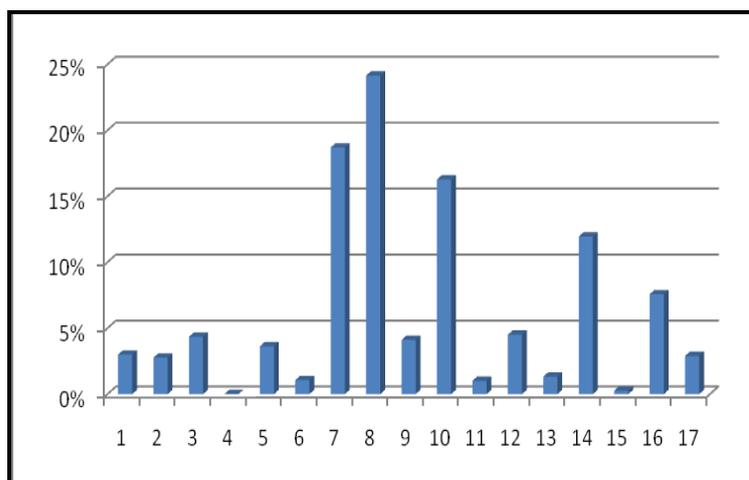


Figura 9: Índice de Germinação (IG%) para os ensaios em consórcio com 7% de óleo diesel após cinco dias de crescimento da raiz.

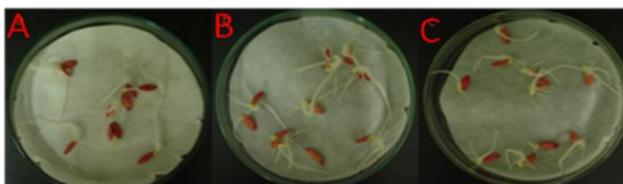


Figura 10: Teste de toxicidade em sementes de pepino verde, utilizando *Cunninghamella echinulata* (a); *Aspergillus terreus* (b), *Penicillium commune* (c) na concentração de 7% de óleo diesel, após 5 dias de cultivo.

4. Conclusão

Os fungos utilizados no trabalho demonstram sua importância nos processos de biodegradação, destacando-se as espécies *A. terreus* e *P. commune*. Porém é observável também que ocorreu degradação para todos os hidrocarbonetos analisados, nas concentrações de 5%, 7% e 9%. Observou-se também que o consórcio entre os fungos testados neste trabalho não foi tão eficaz quanto realizado isoladamente. Os subprodutos dos consórcios são mais tóxicos do que os dos fungos crescidos isoladamente.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a TRANSPETRO pelo suporte técnico.

4. PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINA PEROXIDASE-LIP E LACASE-LAC POR FUNGOS FILAMENTOSOS UTILIZANDO ÓLEO DIESEL COMO SUBSTRATO

Arruda F.V.F., Almeida A.C., Miranda R. M.¹; Maciel C. C.S., Silva P. A., Melo E. J. V., Gouveia E. R., Gusmão, N. B.

Resumo

Vários fungos são conhecidos por terem a propriedade de degradação de poluentes recalcitrantes e xenobióticos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos ou pelos seus subprodutos. O objetivo desse trabalho foi verificar a produção de enzimas Lignina Peroxidase-LiP (E.C:1.11.1.14) e Lacase-Lac (E.C:1.10.3.2), produzidas por *Cunninghamella echinulata*, *Penicillium commune*, e *Aspergillus terreus*. Os ensaios enzimáticos foram realizados com os fungos em culturas puras e em consórcio. A produção de LiP entre os fungos em culturas puras e em consórcio pouco se diferenciou a média com os fungos culturas puras foi de 2.475 U/L e em consórcio 2.601 U/L, para a produção da lacase foi observado uma variação entre as médias de produção enzimática, em culturas puras foi obtido 18.737 U/L e em consórcio 15.133 U/L. Os fungos testados mostraram ser eficazes na produção de enzimas ligninolíticas, possibilitado assim o uso nos processos biotecnológicos.

Palavras chaves: Fungos, Produção Enzimática, Lignina Peroxidase, Lacase

1. Introdução

Os hidrocarbonetos são formados durante a decomposição térmica de moléculas orgânicas e sua recombinação subsequentes (Haritash & Kaushik, 2009). Embora os hidrocarbonetos possam ser objeto de adsorção, volatilização, fotólise, e degradação química, a degradação microbiana é o principal processo de degradação (Yuan *et al.*, 2001). Os fungos vêm sendo amplamente utilizados como produtores de substâncias de interesse econômico, como: enzimas, antibióticos, vitaminas e esteróides (Braga *et al.*, 1999), e vários desses são conhecidos por terem a propriedade de degradação de poluentes persistentes (Haritash & Kaushik, 2009)

A degradação microbiana por fungos lignolíticos tem sido intensamente estudada nos últimos anos. Alguns fungos produzem enzimas extracelulares, tornando-os adequados para a degradação de compostos recalcitrantes (Cajthaml *et al.*, 2001; Haritash & Kaushik, 2009).

Recentemente, os fungos do solo tem sido estudado em relação a sua capacidade de degradar os hidrocarbonetos e produzir enzimas ligninolíticas (Silva *et al.*, 2009).

No sistema ligninolítico os principais grupos de enzimas são lignina peroxidase-LiP (E.C:1.11.1.14) e lacase-Lac (E.C:1.10.3.2). Experimentos com enzimas purificadas provaram que as enzimas ligninolíticas são capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Hofrichter *et al.*, 1998). Estas enzimas são utilizadas principalmente na indústria de biopolpação da madeira, degradação de xenobióticos e biorremediação (Valmaseda *et al.*, 1990; Banerjee & Vohra, 1991; Matheus & Okino, 1998; D'Souza *et al.*, 1999). Este trabalho objetiva a avaliação do potencial de produção de enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos isoladamente e em consórcio.

2. Material e Métodos

2.1. Microrganismos

As espécies utilizadas foram: *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*, previamente isolados do sedimento de manguezal no Recôncavo Baiano e mantidos na Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os fungos foram mantidos no meio agar Sabouraud a temperatura 4°C.

2.2. Condições de cultivo para ensaios enzimáticos culturas puras e em consórcio

Ensaio foram realizados, culturas puras e em consórcio, com os três fungos em frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL do meio Bushnell Haas – BH. Para os isolados foi padronizada uma quantidade de inoculo, contendo 3 blocos (bl) gelose (Ø 6mm) com fungos previamente crescidos e concentração de 7% de óleo diesel, sendo mantidos a temperatura 28°C (\pm 2) sob condição estática. Para a elaboração do consórcio fúngico foi realizado um planejamento experimental fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios com o auxílio do software StatSoft 6.0. Os fungos consorciados foram submetidos a ensaio como descrito anteriormente.

Tabela 1. Matriz obtida no Planejamento experimental fatorial do tipo Delineamento Composta Central Rotacional das três espécies selecionadas para a formação de consórcio

	<i>C. echinulata</i>	<i>P. commune</i>	<i>A. terreus</i>
1	-1 (2bl)	-1 (2bl)	-1 (2bl)
2	1 (4bl)	-1 (2bl)	-1 (2bl)
3	-1 (2bl)	1 (4bl)	-1 (2bl)
4	1 (4bl)	1 (4bl)	-1 (2bl)
5	-1 (2bl)	-1 (2bl)	1 (2bl)
6	1 (4bl)	-1 (2bl)	1 (4 bl)
7	-1 (2bl)	1 (4bl)	1 (2 bl)
8	1 (4bl)	1 (4bl)	1 (4 bl)
9	-1,68 (1bl)	0 (3bl)	0 (3 bl)
10	1,68 (5bl)	0 (3bl)	0 (3 bl)
11	0 (3bl)	-1,68 (1bl)	0 (3 bl)
12	0 (3bl)	1,68 (5bl)	0 (3 bl)
13	0 (3bl)	0 (3bl)	-1,68 (1 bl)
14	0 (3bl)	0 (3bl)	1,68 (5 bl)
15	0 (3bl)	0 (3bl)	0 (3 bl)
16	0 (3bl)	0 (3bl)	0 (3 bl)
17	0 (3bl)	0 (3bl)	0 (3 bl)

bl: bloco de gelose

2.3. Ensaio enzimáticos

As atividades enzimáticas, lignina peroxidase-LiP e lacase - Lac foram medidas espectrofotometricamente da marca Schimadzu-1240 UV/MINI. A atividade da lacase foi determinada usando 2.2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) como descrito por Buswell *et al.* (1995). A mistura foi utilizada usando 0.1 mL de tampão acetato de sódio a 0.1M (pH 5.0), 0.8 mL de uma solução de ABTS a 0.03% (m/v) e 0.1 mL do extrato enzimático e feito a leitura da absorbância a 420 nm. A atividade da lignina peroxidase-LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico de acordo com a metodologia determinada por Buswell *et al.*, (1995). A mistura foi composta por 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH3.0), 500 µL de álcool veratrílico 10 mM, 500 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500 µL de extrato enzimático. Com a adição do peróxido de hidrogênio a reação foi iniciada e a leitura feita a 310 nm. Uma unidade de enzima será definida como 1.0 µmol de produto formado por minuto sob as condições do ensaio.

3. Resultado e Discussão

3.1. Lignina peroxidase e lacase

A produção de lignina peroxidase para os ensaios dos fungos crescidos em culturas puras pode ser observada na tabela 2. *P. commune* foi o isolado com maior produção enzimática, atingindo 2.515 U/L.

Tabela 2: Atividades ligninolíticas para os isolados

Isolados	LiP (U/L)	Lac (U/L)
<i>Aspergillus terreus</i>	2,441	18,335
<i>Cunninghamella echinulata</i>	2,469	18,970
<i>Penicillium commune</i>	2,515	18,905

Para os ensaios em consórcios a lignina peroxidase apresentou melhores produções nas corridas 2 e 1 quando produziu respectivamente, 2.683 U/L e 2.666 U/L; seguido da corrida 11 e 10, com 2.655 U/L e 2.649 U/L, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Atividades das enzimas lignina e lacase para os consórcios crescidos em 7% de óleo diesel

Ensaio	LiP (UL)	Lac (UL)
1	2.666	18.355
2	2.683	18.460
3	2.429	18.440
4	2.518	18.920
5	2.632	13.975
6	2.577	13.845
7	2.593	12.620
8	2.609	15.375
9	2.623	14.810
10	2.649	14.079
11	2.655	13.475
12	2.652	14.745
13	2.574	14.495
14	2.602	15.140
15	2.610	13.780
16	2.598	13.070
17	2.554	13.685

Lignina peroxidase tem sido utilizada para mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes como: hidrocarbonetos e corantes (Wesenberg *et al.*, 2003). Clemente *et al.* (2001) investigaram a degradação de hidrocarbonetos por treze fungos deuteromicetos ligninolíticos e constataram que o grau de degradação varia de acordo as enzimas ligninolíticas. Moreira (2006) relata em seu trabalho realizado com *Psilocybe castanella* produziu uma alta atividade ligninolítica, provavelmente em resposta a concentração do poluente orgânico, hexaclorobenzeno. Anastasi *et al.* (2009), observaram uma produção de lipase por Basidiomycetes de 19 U/L.

A lacase obtida nos ensaios dos fungos isoladamente pouco variou entre as espécies, *C. echinulata* produziu 18.970 U/L, *P. commune* 18.905 U/L e *A. terreus* 18.335 U/L. Com relação aos ensaios em consórcio observa-se uma variação de 12.620 U/L, corrida 7 a 18.920 U/L corrida 4, quando atinge a máxima produção de Lacase (Tabela 2).

Segundo Mougín *et al.* (2003) as lacases oxidam muitas substâncias recalcitrantes como os hidrocarbonetos. Bonugli-Santos *et al.* (2010) trabalhando com meio basal contendo glicose como fonte de carbono, farelo de trigo e sal produziram enzimas a partir de *Mucor racemosus* obtendo 7.537,634 U/L de lipase, porém não observaram nenhuma atividade de lacase. Já o *Aspergillus sclerotiorum* mostrou 1.795,699UL de lipase, e 0.926 U/L de lacase e o *Cladosporium cladosporioides* apresentou 1.741,935 U/L de lipase, porém não detectaram a produção de lacase.

Maciel *et al.* (2010), observaram uma produção de lacase de 290 U/L pelo fungo *Penicillium* sp. (F33) e de lignina peroxidase de 94 U/L \pm 9 para *Paecilomyces* sp.(F11); 100 U/L \pm 22 para *Penicillium* sp. (F21); 100 U/L \pm 14 para *Aspergillus* sp. (F24) e 144 U/L \pm 13 para *Penicillium* sp. (F25).

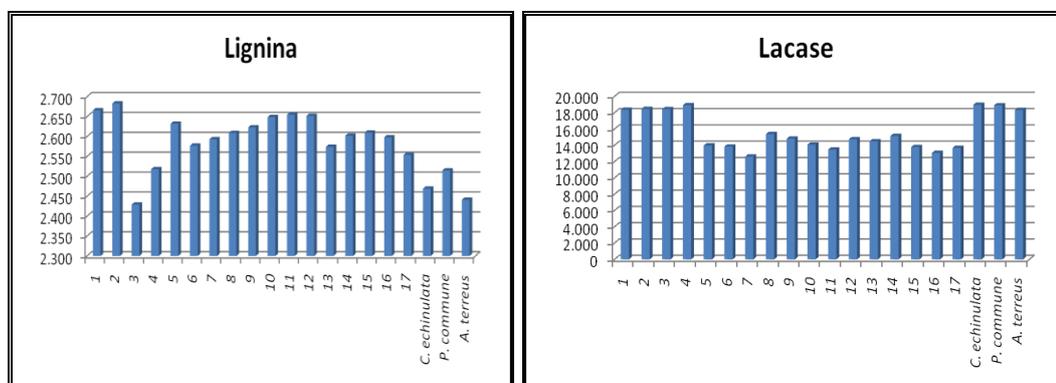


Figura 1: Análise enzimática quantitativa da lignina peroxidase e da lacase dos ensaios do consórcio e isoladamente.

4. Conclusão

Os fungos utilizados no trabalho demonstraram potencial na produção de enzimas ligninolíticas utilizando óleo diesel como substrato, entre as quais a lignina peroxidase e a lacase, porém os fungos quando em consórcio foram mais eficazes na produção da enzima lignina peroxidase, possibilitando assim uma alternativa na obtenção de enzimas, além de ser uma alternativa para a remoção de óleo diesel do meio ambiente.

5. Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e a TRANSPETRO pelo suporte técnico.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Os fungos testados foram capazes de degradar óleo diesel nas concentrações de 5%, 7% e 9%;
- Até a concentração de 7% os índices de germinação da semente do pepino verde foram considerados aceitáveis;
- *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* apresentaram degradação de óleo diesel melhores isoladamente do que quando em consórcio;
- *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* representam importância nos processos de biodegradação do óleo diesel;
- Foi observado uma melhor produção das enzimas, lignina peroxidase e lacase pelos fungos selecionados quando em cultura pura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarry, S.E., Durojaiye, A.O., Solomon, B.O. 2008. Microbial degradation of phenols: a review, *Int. J. Environ. Pollut.* 32:12–28
- Aislabie, J., Saul, D. J., Foght, J. M., 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10:171–179.
- Alef, K. & Nannipieri, P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, p.565.
- Anastasi, A., Coppola, T., Prigione, V., Varese, G. C. 2009. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 1229-1233.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45: 180-209.
- Atlas, R. M. 1995. Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. P. 317-327.
- Arun A., Praveen R. A., Arthi A., Ananthi M., Sathish K. K., Eyini M. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, pseudomonas isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl Biochem Biotechnol* 151:132–42.
- Baek K. H., Kim H., Oh, H. M., Yoon, B. D., Kim, J., Lee I. S. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 39(9):2465-2472.
- Banerjee, U. C., Vohra, R. M. 1991. Production of lacase by *Curvularia* sp. *Folia Microbiol*, v. 36, n. 4, p. 343-346.
- Baird, C. 2002. *Química Ambiental*. Ed. Bookman. São Paulo-SP. p. 662.
- Bennet, J. W., Wunch, K. G. & Faison, B. D. 2002. Use of Fungi Biodegradation in: *Manual of Environmental Microbiology*. Second Edition. ASM Press Washington, D.C., Cp. 87 p.960-971.
- Bento, F. M., Camargo F. A. O., Okeke, B. C., Frankenberger, W. T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96:1049–1055.

- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., Silva, M., Sette, L. D. 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 46:32–37.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal–bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1007–1019.
- Braga, G. U. L., Destéfano, R. H. R., Messias, C. L. 1999. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 2, p. 107-113.
- Buswell, J.K, Cai, Y.J, Chang S.T. 1995. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett*;128:81–8.
- Cai Q., Mo, C., Wu, Q., Katsoyiannis, A., Zeng, Q. 2008. The status of soil contamination by semivolatile organic chemicals (SVOCs) in China: a review, *Sci. Total Environ.* 389: 209–224.
- Cajthaml T., Pacakova V., Sasek V. 2001. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Listy.* 95:404.
- Clemente A.R., Anazawa T.A., Durrant L.R., 2001 Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi, *Braz. J. Microbiol.* 32:255–261.
- Cammarota, M. C., Freire, D. M. G. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, 97: 2195-2210.
- Campos, A.C., Epaminondas, L. 1989. *Petróleo e Derivados*, Rio de Janeiro, Ed. Técnica Ltda.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2010. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em Abril: 01 outubro 2010.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2004. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em Abril: 27 setembro 2010.
- Chaillan, F., LÊ Fleche, A., Bury, E., Phantavong, Y. H., Grimont, P., Saliot, A. & Oudot, J. 2004. Identification and Biodegradation Potential of tropical Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. *Research Microbiology*.
- Cheung, P.Y., Kinkle, B.K. 2005. Effects of nutrients and surfactants on pyrene mineralization and *Mycobacterium* spp. populations in contaminated soil, *Soil Biol. Biochem.* 37: 1401–1405.

- Cunha, C. D. 1996. "Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo". Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, p 97.
- Drago, T. 2003. O Acidente marítimo mais caro da história. Disponível em: <[HTTP:www.tierramerica.net/2003/0728/particulo.shtml](http://www.tierramerica.net/2003/0728/particulo.shtml)>. Acesso em: 30 setembro 2010.
- D'Souza D.T., Tiwari R., Sah A.k., Raghukumara C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 38:504–11.
- D'Souza, T. M.; Merrit, C. S.; Reddy, C. A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*. 65(12): 5307-5313.
- Duran, N.; Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environm.* 28, 83-99,
- Esposito, E., Azevedo, J. L. 2004. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 510p.
- Fernandez-Sanchez, J. M., R. Rodriguez-Vazquez, G. Ruiz-Aguilar, and P. J. J. Alvarez (2001) PCB biodegradation in aged contaminated soil: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *J. Environ. Sci. Health A* 36: 1145-1162.
- Gaylarde, C.C., Bento, F.M., Kelley, J. 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de Microbiologia* 30: 01-10.
- Ghazali, F. M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Internacional Biodeterioration & Biodegradation*. 54: 61-67.
- Gianfreda L., Xu F., Bollag J-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat* 3:1–25.
- Gianfreda L., Rao M. A. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Technol* 35:339–54.
- Gogoi, B. K., Dutta, N. N., Goswami, P. e Krishna Mohan, T.R. 2003. A Case Study of Bioremediation of Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Soil at a Crude Oil Spill Site. *Advances in Environmental Research*, 7:767-782.
- Hanson, K. G.; Desai, D.; Desai, A. J., 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*. 7 (10): 745-748.

- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169:1–15.
- Hofrichter, M., Schneibner, K., Schneegab, I., Fritzsche, W. 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:399–404.
- IТОPF (International Tanker Owners Pollution Federation). Disponível em: <<http://www.itopf.com/>>. Acesso em Abril: 27 setembro 2010.
- Jones, J. G., Eddington, M. A. 1968. An ecological survey of hydrocarbon oxidizing microorganisms. *Journal of General Microbiology*, 52:381-390.
- Jorgensen K. S., Puustinen, J., Suortti A. M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environment International*, Elmsford 107:245-254.
- Kataoka, A. P. A. G. 2001. Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de landfarming 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Kennish, M.J. 1992. *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. CRC Press, Inc. Florida p. 133-181.
- Kohlmeier, S., Smits, T.H., Ford, R.M., Keel, C., Harms, H., Wick, L.Y., 2005. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environ. Sci. Technol.* 39:4640–4646.
- Koren, O., Knezevic, V.; Ron, E.Z., Rozemberg, E. 2003. Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acids the Nitrogen Source. *Applied and environmental Microbiology* 69 (10): 6337-6339.
- Kotterman, M.J.J., Vis, E.H., Field, J.A., 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2853–2858.
- Kunz, A. Peralta-Zamora, P., Moraes, S.G., Durán, N. 2002. Novas tendências no tratamento de efluentes industriais. *Química Nova*. 25(1): 78-82.
- Lemos, J. L. S. 2001. Emprego de fungos no tratamento de solos contaminados com petróleo - Revisão bibliográfica. Relatório técnico parcial elaborado para o CETEM/MCT. Biblioteca do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, RT 2001-51-00.

- Lopez M. J., Vargas-García M. C., Suárez-Estrella F., Nichols N. N., Dien B. S., Moreno J. 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb Technol* 40:794–800.
- Macedo, R. C., Berbert, V. H. C., Lemos, J. L. S., Trindade, P. V. O., Rizzo, A. C. L. 2002. “Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos”. Trabalho apresentado na X jornada de Iniciação científica - Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientadores: Judith Liliana. S. Lemos, Pedro V. Trindade e Andrea C. de L. Rizzo.
- Maciel, C. C. S., Souza, M. A. Gusmão, N. B., Campos-Takaki, G. M. 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactado por petroderivados. *Exacta*, São Paulo. 8(2): 133-144.
- Margesin, R., & Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3127–3133.
- Mariano, A. P. 2006. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminadas com óleo diesel. 147p. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Matheus, D. C., Okino, L. K. 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Bononi, V. L. R., Grandi, R. A. P. (Eds.). *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica, 107-139.
- Mazzuco, L.M. 2004. Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel, 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Melo, I. S., Azevedo, J. L. 2008. *Microbiologia Ambiental*. 2ed. Cap. 24. Embrapa Meio Ambiente. Jauariúna, SP.
- Miranda, R.C., Souza, C. S., Gomes, E.B.; Lovaglio, R. B., Lopes, C. E.; Sousa, M. F. V. Q. 2007. 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* 50 (1):147-152.
- Mishra, S. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 67 (4):1675-1681.

- Moreira, S. L. M. N. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno, 124p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Mougin, C., Jolival, C., Briozzo, P. & Madzak, C. 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters*. 1: 145-148.
- Nicodem, D. E., Guedes, C. L. B., Fernandes, M. C. Z., Correa, R. J., Severino, D., Coutinho, M., Silva, J. 2001. Photochemistry of Petroleum. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 26: n. 2/3, p.219-238.
- NRC (National Research Council) 1985. Oil in the sea, inputs, fates and effects. Washington. D.C., National Academy Press. 602p.
- Nyanhongo G. S., Gomes J., Gübitz G., Zvauya R., Read J.S., Steiner W. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresour Technol* 84: 259–63.
- Oliveira, M. C. D. 2002 Disponível em: <<http://www.cetesb.gov.br>>. Acesso em 28 setembro 2010.
- Paixão, J.F., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.L., Carvalho, G.C., Silveira Jr., J.S. C., Rebouças, M., Matias, G.R.A., Rodrigues, I.L.P., 2007. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: an approach to minimize environmental pollution risk. *Environ. Res.* 103:365-374.
- PETROBRAS, 2010. Bunker. Produtos e Serviços. Disponível em: <http://www2.petrobras.com.br/produtos_servicos/port/Produtos>. Acesso em: 01 de outubro de 2010.
- Pirôllo, M. P. S., 2006. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Poffo, I. R. F. 2000. Vazamentos de óleo no litoral norte de São Paulo: análise histórica (1974-1999). Dissertação de mestrado. USP/PROCAM. Programa de pós-graduação em Ciências Ambientais, São Paulo.
- Providenti, M. A., Lee, H. e Trevors, J. T. 1993. Selected Factors Limiting the Degradation of Recalcitrant Compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, 12 (6): 379-395.
- Reardon, K.F. Mosteller, D.C. Rogers, J. 2000. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biotechnol. Bioeng.* 69:385-400.

- Riser-Roberts, E. 1992. Bioremediation of petroleum contaminated sites. Boca Ratón, FL. CRC Press.
- Rivera-Cruz M. C. & Trujillo-Narcia, A. 2004. Estudio de toxicidade vegetal em suelos com petróleos nuevo e inteperizado. *Interciencia* 29 (7): 369-376.
- Rocha P. S., Souza, A. O. Câmara R. J. 2002. O futuro da Bacia do Recôncavo, a mais antiga província petrolífera brasileira. *Bahia Análise & Dados*, 11: 32-44.
- Rodrigues, R. 1984. Indicadores geoquímicos moleculares (biomarcadores) aplicados à exploração de petróleo. In: *Geoquímica do petróleo*, CENPES-Petrobras. 157-190.
- Rosato, Y. B. 1997. Biodegradação do Petróleo. In: *Microbiologia Ambiental*. ed. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPMA). Jaguariúna, SP. 307-334.
- Sanchez S., Demain A. L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes, *Enzyme Microbial Technology*, 31:895-906.
- Sette L. D., de Oliveira V. M. , Rodrigues M. F. A. 2008. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microb Aust* 29:18–20.
- Shay, E. G. 1993. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. *Biomass Bioenergy* 4: 227-242.
- Silva, P.R. 2004. Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Ciência e Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Silva, F. A. S. D. 2009. Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar. 175p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco, Recife.
- Souza C. S. 2008. Degradação de óleo diesel por fungos 69p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Tiquia, S. M.; Tam, N. F.; Hodgkiss, I. J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, 93(3):249-256.
- Tissot, B.P., Welte, D. H. 1984. *Petroleum Formation and Occurrence*. 2a. ed. Berlin, Springer-Verlag.
- UNEP (United Nations Environment Programme). 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. *Reference methods for marine pollution studies* 20: 97.

- Ururahy, A. F. P., Pereira Jr, N., Marins, M. D. M. 1998. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. Boletim Técnico da Petrobrás. 41: 125-132.
- Uyttebroek, M. Vermeir, S. Wattiau, P. Ryngaert, A. Springael, D. 2007. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarboncontaminated soil for growth on pyrene at low pH, Appl. Environ. Microbiol. 73: 3159–3164.
- Valmaseda, M., Almendros, G., Martínez, A. T. 1990. Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 33:481-484.
- Velázquez-Cedeño, M. A., Mata, G., Savoie, J. M. 2002. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe chages in the production of some lignocellulolytics enzyme. Word Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(3), 201-207.
- Ward, O., Singh, A., Van Hamme, J. 2003. Accelerated Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon Waste. J. Ind. Microbiol Biotechnol, 30:260 – 270.
- Walker, J. D., Colwell, R. R., Vaituzis, Z. Meyer, S. A. 1975. Petroleum – degrading achlorophillous alga *Prototbeca zopfi*. Nature. London. 254:423-434.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. & Agathos. S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances. 22: 161-187.
- Wick, L.Y., Remer, R., Wu¨ rz, B., Reichenbach, J., Braun, S., Scha¨fer, F., Harms, H. 2007. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. Environ. Sci. Technol. 41, 500–505.
- Yuan,S.Y., Chang, J.S., Yen, J.H., Chang, B.V. 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment, Chemosphere 43: 273–278.
- Zobell, C. E. 1946. Action of microorganisms on hidrocarbons. Bacteriological Reviews, 10:1-49.

