



DIANA DUARTE DE LIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Aspergillus* sp. QUANTO A CAPACIDADE DE
DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL**

RECIFE

02/2014



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

**CARACTERIZAÇÃO DE *Aspergillus* sp. QUANTO A CAPACIDADE DE
DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL**

DIANA DUARTE DE LIRA

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 de interesse industriais

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Cristina M. de Souza Motta

RECIFE

02/2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lira, Diana Duarte de
Caracterização de *Aspergillus sp.* Quanto a capacidade de degradação de óleo diesel / Diana Duarte de Lira. – Recife: O Autor, 2014.

59 folhas: il.

Orientadores: Norma Buarque de Gusmão, Cristina M. de Souza Motta
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

Inclui bibliografia e apêndices

1. Fungos 2. Biorremediação 3. Biologia – Classificação 4. Diesel I. Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Motta, Cristina M. de Souza (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-258

**CARACTERIZAÇÃO DE *Aspergillus* sp. QUANTO A CAPACIDADE DE
DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL**

DIANA DUARTE DE LIRA

Data de defesa: 25 de Fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

Dr^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Edelvio de Barros Gomes
Instituto Federal da Bahia

Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças para continuar e me guiar.

As minhas filhas, Beatriz e Letícia, fonte minhas inspirações e a razão de todos meus esforços.

As minhas amigas Milkaellen, Cláudia e Valdirene pela amizade, e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus amigos, que de alguma forma colaboraram para realizar esse trabalho, seja me ajudando nos meus experimentos ou dando aquele apoio que só amigos pode nos dar.

Patrícia, Helena, Pérsio, Flávia, Erik, Robson, Nelânia, Luiz Neto, Luis Cláudio, Raul, Rosilma, Evelyne, Maria Cláudia, Marcela, Glêzia Renata.

Aos que não estão tão perto mas que continuam dando aquela força, Rita, Edelvio, Talyce, Maira, Carla Maciel.

A Prof^a Gláucia pelo apoio

A Norma por me orientar e apoiar nas horas mais difíceis em minha vida.

A minha Co-orientadora Cristina Motta

A professora Maria José da Micoteca do Departamento de Biologia de Fungos

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia de Fungos

A todos que contribuíram para que desse certo

Agradeço.

RESUMO

A taxonomia clássica de fungos filamentos é baseada em observações de características fenotípicas, além de incorporar as aplicações biotecnológicas das substâncias produzidas à otimização de processos. Os fungos por participarem da ciclagem de material orgânico são hábeis em descontaminar ambientes. Este trabalho teve por objetivo a identificação de 23 espécies de *Aspergillus* isolados de água do mar e estuário com a capacidade de utilizar óleo diesel como fonte de carbono. Para taxonomia clássica foram utilizados meios diferenciais. Após a identificação foi realizado o teste com o indicador 2,6 diclofenolindolfenol, e foram selecionados os que apresentaram mudança da coloração do indicador com 24 horas após início do ensaio. As linhagens selecionadas foram submetidas aos ensaios de aclimação, otimização das condições nutricionais do meio de cultivo e toxicidade dos subprodutos provenientes do biotratamento utilizando o índice de germinação o qual analisa a germinação e crescimento médio de sementes vegetais. Para otimização de ensaio de degradação foi utilizado o planejamento experimental Delineamento Composto Central com três variáveis independentes: nitrogênio, fósforo e magnésio. Foram identificadas as espécies *Aspergillus flavus*(06), *Aspergillus aculeatus*(08), *Aspergillus terreus*(01), *Aspergillus awamori*(02), *Aspergillus tamarii*(01), *Aspergillus japonicus*(03), *Aspergillus niger*(02). Oito linhagens apresentaram viragem da coloração azul para incolor em 24 horas, mas o *Aspergillus flavus* (AFL59) foi selecionado para todos os testes por apresentar 80% de degradação. A linhagem submetida ao ensaio de otimização apresentou o Índice de Germinação com valores próximos a 100% crescimento da raiz e eficiência de degradação (E.D%) do óleo diesel próximo a 100% para o hidrocarboneto nonano, ausência de picos entre decano e hexadecano, e a partir de heptadecano até heneicosano as porcentagens variaram entre 20,85% e 37,11%. Concluímos que o tratamento de óleo diesel utilizando as linhagens de *Aspergillus* mostrou-se eficiente para degradação de cadeias de hidrocarbonetos maiores apresentando baixa toxicidade para o nível trófico utilizado para o ensaio.

Palavras-chave: Biorremediação, Taxonomia, *Aspergillus*, Óleo diesel.

ABSTRACT

Classical taxonomy of filamentous fungi is based on observations of their phenotypic characteristics, in addition, it incorporates biological applications of substances produced from the optimization process. Fungi, playing a major role in recycling organic material, may be used in environmental decontamination. The main goal of this thesis was the identification of 23 species of *Aspergillus* isolated from the sea and estuary capable of using diesel oil as a carbon source. Different media were used for classical taxonomy. After identification, the test with 2,6-Dichlorophenol Indophenol as indicator was performed; therefore, the species which changed color throughout the experiment after 24 hours were selected. Several experiments were performed with the selected strains: temperature acclimation, nutrient media optimization, toxicity of the byproducts from the treatment using germination rate which analyze the average germination and growth of seeds. To optimize the degradation assay, Delineation Central Composite experimental design was used with three independent variables: nitrogen, phosphorus and magnesium. The following species were identified: *Aspergillus flavus*(06), *Aspergillus aculeatus*(08), *Aspergillus terreus*(01), *Aspergillus awamori*(02), *Aspergillus tamarii*(01), *Aspergillus japonicus*(03), *Aspergillus niger*(02). Eight strains presented a change of color from blue to colorless in 24 hours. However, *Aspergillus flavus* (AFL59) showed 80% degradation which was the reason it was selected for all the tests. The strain, on nutrient media optimization test, showed germination rate values close to 100%, roots growth and degradation efficiency (ED%) of diesel close to 100% for hydrocarbon nonane, absence of peaks between decane and hexadecane, and from heptadecane up to heneicosane had a percentage variation between 20.85% and 37.11%. In conclusion, the diesel oil treatment performed with *Aspergillus* proved effective in the degradation of larger hydrocarbon chains having low toxicity for the trophic level used in the test.

Keywords: Biodegradation, Taxonomy, *Aspergillus*, Diesel oil.

Lista de figuras

	Pg.
Figura 1 – Características microscópicas observadas na identificação morfológica de espécies de <i>Aspergillus</i>	17
Figura 2 – Formato das vesículas características do gênero <i>Aspergillus</i> e utilizadas como parâmetro taxonômico. a – globoso ou esférica; b – piriforme; c – espatulada; d – clavada.....	17
Figura 3 - Incidente ocorrido no Campo do Frade na Bacia de Campos no litoral de Rio de Janeiro – Chevron Brasil Petróleo Ltda.....	21
Figura 4 – Empresa Termope – Grupo Neo.....	25
Figura 5 - <i>Aspergillus aculeatus</i> após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extra de levedura (CYA) (A- Reverso, B- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (C- Reverso, D- Verso) Agar Czapek dox (CZ) (E- Reverso, F- Verso).....	31
Figura 6 - <i>Aspergillus flavus</i> após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (L- Reverso, K- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (J- Reverso, I- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (H- Reverso, G- Verso).....	32
Figura 7- <i>Aspergillus niger</i> após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (R- Reverso, Q- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (P- Reverso, O- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (N- Reverso, M- Verso).....	33
Figura 8 - <i>Aspergillus terreus</i> após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extra de levedura (CYA) (W- Reverso, X- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (V- Reverso, U- Verso) Agar Czapek dox (CZ) (T- Reverso, S- Verso).....	34
Figura 9- Viragem do corante DCPIP. Por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> com 24, 48 e 72 horas A- <i>Aspergillus flavus</i> , 24 hs; B- <i>Aspergillus aculeatus</i> , 48 hs; C- <i>Aspergillus japonicus</i> , 72 hs. Legenda: 1 – controle negativo; 2 – controle positivo; 3, 4, 5 – tratamento com óleo diesel.....	37
Figura 10- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus aculeatus</i> (AAC03) na porcentagem de 5%.....	39
Figura 11- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus flavus</i> (AFL10) na porcentagem de 5%.....	39
Figura 12- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus flavus</i> (AFL13) na porcentagem de 5%.....	40
Figura 13- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus aculeatus</i> (AAC38) na porcentagem de 5%.....	40
Figura 14- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus flavus</i> (AFL46) na porcentagem de 5%.....	41
Figura 15- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus flavus</i> (AFL59) na porcentagem de 5%.....	41
Figura 16- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus niger</i> (ANI107) na porcentagem de 5%.....	42
Figura 17- Degradação de óleo diesel por <i>Aspergillus tamarii</i> (ATA122) na porcentagem de 5%.....	42
Figura 18 - Teste de fitotoxicidade. A – Controle positivo; B – Controle negativo; C – Tratamento com resíduo.....	45

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1 – Classificação do gênero <i>Aspergillus</i> segundo GAMS et al., (1985).....	14
Tabela 2 – Meios de cultivos descritos em Klich (2002) para identificação de espécies de <i>Aspergillus</i>	16
Tabela 3 – Micotoxinas conhecidas e relacionadas aos seus produtores.....	18
Tabela 4 – Tipos de biorremediação.....	23
Tabela 5 – Matriz de planejamento fatorial	28
Tabela 6- Espécies de <i>Aspergillus</i> spp. procedentes de água salgada e do rio Ipojuca localizado no complexo portuário Suape no Cabo de Santo Agostinho-PE.....	30
Tabela 7- Caracterização fenotípica das linhagens de <i>Aspergillus</i> sp.	35
Tabela 8- Resultados dos ensaios de fitotoxicidade da otimização.....	45
Tabela 9- Resultados dos ensaios de fitotoxicidade da otimização.....	45

Gráficos

	Pág.
Gráfico 1 - Linhagens de fungos filamentosos isoladas de águas do porto de Suape- PE.....	30
Gráfico 2 - Resultados do teste de seleção DCPIP.....	30
Gráfico 3 - Eficiência de degradação do óleo diesel, na concentração de 5%, dos ensaios (44 otimização por <i>Aspergillus flavus</i> – AFL59.....	44
Gráfico 4 - Desvio padrão e média do índice de crescimento das raízes do teste fitotoxicidade.....	46
Gráfico 5 - Desvio Padrão e Média do índice de germinação do teste de fitotoxicidade	46
Gráfico 6 - Índice de Germinação (IG%) das sementes de pepino caipira, crescidas na concentração 5% de óleo diesel após cinco dias de crescimento da raiz.....	46

Sumário

	Pág.
1.INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1. O Gênero <i>Aspergillus</i>	14
2.2.Taxonomia Clássica do <i>Aspergillus</i>	15
2.3. Importância Biotecnológica do Gênero.....	17
2.4. <i>Aspergillus</i> Isolados de Ambiente Marinho.....	20
2.5. Biorremediação petroderivados por <i>Aspergillus</i>	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Micro-organismos	25
3.2. Análise Morfológica	25
3.3. Teste com o Indicador redox 2,6- diclofenol-indofenol (DCPIP).....	26
3.4. Seleção de Linhagens para Otimização.....	26
3.5. Otimização e Planejamento Experimental.....	27
3.6. Toxicidade.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Identificação de Linhagens por Caracterização Morfológica.....	29
4.2. Teste de Seleção com indicador DCPIP.....	36
4.3. Seleção para Definir as Linhagens para Otimização.....	38
4.4. Otimização.....	43
4.5. Toxicidade.....	44
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIA.....	48
Apêndices.....	57

1. INTRODUÇÃO

A taxonomia clássica é baseada em observações de características microscópicas e macroscópicas de estruturas fúngicas. Neste tipo de identificação é observado o desenvolvimento de características fenotípicas específicas e produção de esporos, e a incorporação de aplicações biotecnológicas das substâncias produzidas por estes fungos visando a otimização de processos tem sido útil. A identificação de fungos filamentosos é útil visto que são utilizados em processos biotecnológicos, como a biorremediação a qual utiliza micro-organismos para recuperar ambiente contaminado (SILVA *et al.*, 2011; RAPER & FENNELL, 1965).

A biorremediação por fungos filamentosos é vista como promissora, uma vez que eles apresentam capacidade degradativa frente a metais pesados, hidrocarbonetos e corantes devido a grande variedade de enzimas que produzem permitindo que metabolizem diversos tipos de substratos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005; URURAHY *et al.*, 1998). Então, a biorremediação é descrita como a capacidade de organismos vivos, em especial micro-organismos, transformarem compostos recalcitrantes e xenobióticos em compostos menos tóxicos, CO₂ e água, além de apresentar custo efetivo (BAKER & HERSON, 1994; RAHMAN *et al.*, 2002).

A biorremediação também é aplicada em ambientes contaminados por petróleo e petroderivados, que se utiliza das habilidades fúngicas e outros fatores para estimular a degradação do contaminante. Vários fatores influenciam o potencial de biodegradabilidade fúngico como características fisiológicas, aclimação, suplementação de nitrogênio e fósforo (relação C:N:P), tamanho do inóculo, disponibilidade de água, aeração, pH, temperatura, estrutura química dos compostos recalcitrantes, entre outros. Fungos filamentosos isolados de ambiente marinho, capazes de degradar petróleo e seus derivados são bem relevantes visto que os maiores incidentes ocorrem no mar (PEREIRA Jr *et al.*, 2009).

O óleo diesel, um petroderivado, composto principalmente de hidrocarbonetos saturados e, em quantidade menor, constituintes como nitrogênio, enxofre e oxigênio. O óleo diesel possui baixa solubilidade em água, sendo recalcitrante para o meio ambiente e de fácil absorção por organismos vivos e, ainda apresenta propriedades carcinogênicas e mutagênicas (JACQUES *et al.*, 2005; JACQUES *et al.*, 2007). Acidentes com óleo diesel no mar apresentam inúmeras dificuldades como a difícil contenção na superfície da água e

os danos que causam a biota marinha como morte de peixes, aves marinhas e outras formas de vidas aquáticas. O objetivo deste trabalho é identificar e selecionar linhagens de *Aspergillus* spp. isoladas da água do mar e do Rio Ipojuca no trecho localizado no Complexo Portuário de Suape no município de Ipojuca-PE, com potencial para degradar óleo diesel.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez, em 1729, pelo sacerdote florentino e micologista Pietro Antonio Micheli. Ele deu-lhe este nome por considerar sua estrutura semelhante a um hissope, estrutura utilizada pela igreja católica para aspergir água benta. Este gênero pertence à família Tricomaceae, ordem Eurotiales, à classe Ascomycetes, que pertence a Divisão Ascomycota, Reino Fungi (KIRK et al., 2008).

Este gênero também é bastante distribuído e abundante sobre a Terra, graças a uma grande variedade de metabolitos que produz possibilitando habitar diferentes nichos (KLICH, 2002).

Raper e Fennell (1965) descreveram 132 espécies e 18 variedades, formando 150 táxons em seu livro “The genus *Aspergillus*”. Neste trabalho foi descrito o gênero como anamorfo para sua fase assexuada e teleomorfo para sua fase sexuada. O gênero foi dividido em “grupos” baseados em características morfológicas e fisiológicas. Estes grupos foram revisados e subdivididos (subgêneros e seções) por Gams e colaboradores em 1985 como é mostrado na Tabela 1. Pitt et al. (2000) descreveu 182 táxons e Samson mais 36 entre os anos de 1992 e 1999.

Tabela 1. Classificação do gênero *Aspergillus* segundo Gams et al., (1985)

SUBGÊNERO		SEÇÃO	CARACTERES
<i>Aspergillus</i>	Unisseriado, xerofílico, conídio verde-cinza, cresce em CY20S>CYA25	<i>Aspergillus</i>	Teleomorfo Eurotium- Cleistotécio amarelo com parede composta por uma única camada de células pseudoparenquimatosa poligonal, ascósporos hialinos
		<i>Restricti</i>	Estritamente anamórfico, crescimento lento em todos os meios de cultivos
<i>Ornati</i>	Unisseriado, conídio verde-cinza, verde-amarelo ou marrom-oliva		
<i>Nidulantes</i>	Bisseriado, conídio com cores variadas	<i>Nidulantes</i>	Estipes curtas e muitas vezes marrons, conídio verde, células Hülle muitas vezes presente, muitas espécies com teleomorfo Emericella. Cleistotécio, cercado por células Hülle, ascósporos vermelho a roxo

		<i>Versicolores</i>	Estipes hialina a marrom, conídio verde, verde-cinza ou verde-azul
		<i>Usti</i>	Estipes marrom, conídio vermelho, marrom a oliva
		<i>Terrei</i>	Estipes hialino, conídio castanho a marrom-laranja
		<i>Flavipedes</i>	Estipes hialino a marrom pálido, conídio branco a castanho
SUBGÊNERO		SEÇÃO	CARACTERES
<i>Circumdati</i>	Unisseriado bisseriado, vesícula esférica piriforme	<i>Wenti</i>	Conídio castanho, marrom-amarelo ou marrom-oliva
		<i>Flavi</i>	Conídio verde-amarelo a marrom-oliva
		<i>Nigri</i>	Estipes parede lisa, conídio preto
		<i>Circumdati</i>	Predominantemente bisseriado, conídio amarelo, castanho ou ocraceo
		<i>Candidi</i>	Conídio branco ou quase branco
		<i>Cremai</i>	Conídio marrom, amarelo ou verde-azul
		<i>Sparsi</i>	Conídio cinza pálido a castanho oliva
<i>Stilbothamni</i>	Espécies formando sinêmio		
<i>Fumigati</i>	Unisseriado, vesículas predominantemente piriforme, conídio verde-cinza, verde-azul a laranja	<i>Fumigati</i>	Conídio verde-cinza a verde-azul
		<i>Cervini</i>	Light-laranja a verde-laranja
<i>Clavati</i>	Unisseriado, vesícula predominantemente clavata, conídio verde-cinza	<i>Clavati</i>	Unisseriado, vesícula predominantemente clavata, conídio verde-cinza

Fonte: Klich M. A. (2002)

2.2.Taxonomia Clássica do Gênero *Aspergillus*

A identificação clássica se baseia em observação de caracteres morfológicos e fisiológicos e é utilizada por taxonomistas para caracterizar este gênero. O gênero *Aspergillus* possui características que o identificam e diferem de outros gêneros, no entanto para a identificação de espécies, em alguns casos, a taxonomia clássica apresenta dificuldades (KLICH, 2002). O gênero *Aspergillus* é reconhecido através de características microscópicas próprias como exemplo, a estipe do conidióforo terminando com uma

vesícula (uma dilatação no ápice), a qual é coberta por uma ou duas camadas de células especializadas e conídios que são formados assexuadamente. Estas células que formam os conídios são chamadas de células conidiogênicas ou fiálides, e sua conidiogênese é do tipo blástica fialídica. Quando a fiálide esta inserida diretamente na vesícula, então é chamado *Aspergillus* unisseriado. Se ocorrer uma segunda camada de células interligando a fiálide a vesícula, o *Aspergillus* é referido como bisseriado e, esta é denominada métula. O formato em “T ou L” da parte basal da estipe, denominada “célula pé” também é considerado como uma característica desse grupo (KLICH, 2002). Após a incubação, em meio de cultura específico, as espécimes são analisadas quanto aos seus aspectos macroscópicos como coloração e diâmetro das colônias, presença de exudato e pigmentos solúveis. Quanto aos caracteres microscópicos a seriação, vesícula, conídios, estirpe, células Hülle, cleistotécio, esclerócios e ascósporos são observados. Dentre muitas características uma importante para diferir as espécies é tamanho, coloração e ornamentação das paredes dos conídios (KLICH, 2002). Também são observados características fisiológicas como produção de enzimas e ácidos graxos, bem como outros parâmetros como análise de água, pH, temperatura de crescimento e crescimentos em meios específicos como descrito por Maren e Klich (2002) listados na Tabela 2.

Tabela 2. Meios de cultura descritos em Klich (2002) para identificação de espécies de *Aspergillus*.

Meio	Descrição	Incubação	Autor
CYA25	Agar Extrato de levedura Czapek	7 dias 25°C	Pitt, 1973
CYA37	Agar Extrato de levedura Czapek	7 dias 37°C	Pitt, 1973
CY20S	Agar Extrato de levedura Czapek com 20% de sacarose	7 dias 25°C	Pitt & Hocking, 1985
MEA	Agar Extrato de Malte	7 dias 25°C	Blakeslee, 1915
CZ	Agar Solução Czapek Dox	7 dias 25°C	Dox, 1910

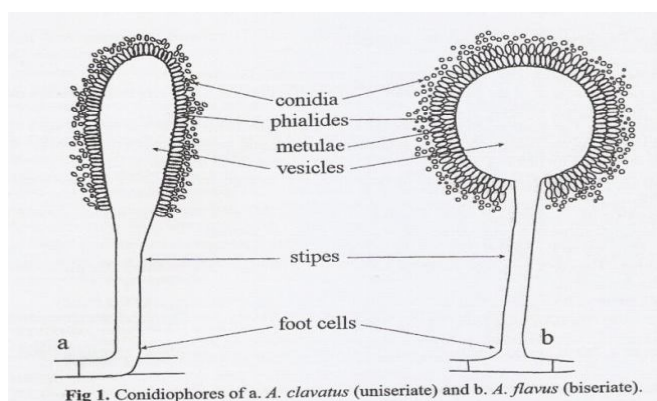


Figura 1. Característica microscópicas observadas na identificação morfológica de espécies de *Aspergillus*.

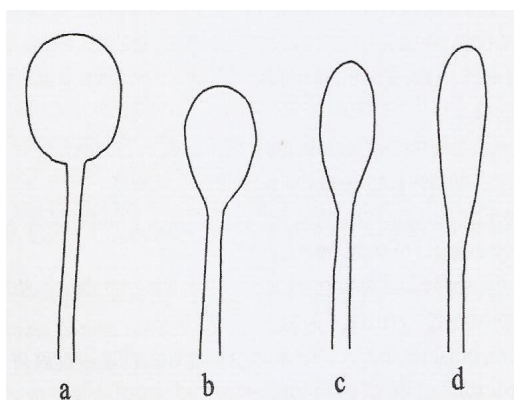


Figura 2. Formatos das vesículas características do gênero *Aspergillus* e utilizadas como parâmetros taxonômicos. a- Globoso ou esférica; b- Piriforme; c- Espatulada; d- Clavada

2.3. Importância Biotecnológica do Gênero

Muitas drogas comercializadas como antibióticos, agentes antitumorais e antifúngicos foram desenvolvidas a partir de metabolitos produzidos por *Aspergillus*. Muitas de suas espécies são conhecidas por produzirem enzimas e ácidos orgânicos de grande importância econômica e biotecnológica, e ainda na indústria alimentícia são utilizadas na produção de alimentos asiáticos como sakê, molho de soja e koji, e contribui para o sabor e coloração de alimentos, utilizando amilases proveniente de *A. niger*, *A. aculeatus* e *A. oryzae* (HARA et al., 1992).

Aspergillus flavus, amplamente distribuído, é utilizado pela indústria, principalmente pela sua produção de enzimas, por exemplo, a indústria de bebidas

alcoólicas e alimentos de soja. Também foi descrito na produção de antibióticos e antifúngicos (KLICH, 2002; RAPER & FENNELL, 1965).

Muitas espécies são conhecidas por seus aspectos negativos como a patogenicidade em animais, plantas e humanos e outras são alergênicas. O gênero *Aspergillus* inclui patógenos oportunistas que estão associados a pessoas imunocomprometidas, por exemplo, o *A. fumigatus*, causando aspergiloses, no qual em alguns casos são fatais. As aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* estão relacionadas à contaminação de alimentos, e podem causar a morte de animais e até humanos causando aflatoxicose e/ou câncer hepatotóxica e nefrotóxica (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, 1997; PACHECO et al. 2010; HEDAYATI et al, 2007). Estas espécies produzem toxinas (Tabela 3) chamadas de micotoxinas, atacando pré e pós a colheita e infestando produtos armazenados contaminando vários tipos de alimentos sob condições inadequadas de estoque. *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* e *A. clavatus* são alguns dos produtores de toxinas (ADAM et al. 1998; WANGIKAR, et al, 2005; GRAHAM et al, 1982; LEONI et al, 2001; MARÍN et al, 2004; KLICH, 2002; MICHAILIDES et al, 2007; YU et al, 2005).

Tabela 3. Micotoxinas conhecidas e relacionadas aos seus produtores

Espécie	Toxinas
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxinas-B1, B2, G1, G2; ácido aspergílico e ácido hidroxiaspergílico; ácido oxálico
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxinas-B1, B2, G1, G2
<i>Aspergillus clavatus</i>	ascladiol
<i>Aspergillus fumigatus</i>	gliotoxina
<i>Aspergillus chvalieri</i>	gliotoxina
<i>Aspergillus terreus</i>	gliotoxina; ácido terreico
<i>Aspergillus ustus</i>	austamide
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ocratoxinas
<i>Aspergillus glaucus</i>	ácido oxálico

Encontrado em solo, *Aspergillus awamori* foi citado em estudos sobre produção de enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases e pectinases) em fermentação sólida utilizando resíduos da indústria de vinhos (BOTELLA et al. 2005). Este fungo também esta

relacionado a outros estudos como a processos de síntese de tanase, purificação de (1,4)- α -D-arabinoxylana Arabinofuranohydrolase, pesquisas envolvendo produção de glucoamilase (KORMELINK et al., 1991; ALESHIN et al., 1992; NUNBERG et al., 1984; PAVEZZI et al., 2008).

Aspergillus niger é amplamente distribuído e capaz de crescer em quase todo tipo de substrato orgânico, sendo encontrado no solo, grãos, frutas estragadas, vegetais, tecidos de algodão, couro, lácteos e outros substratos ricos em proteínas (RAPER & FENNELL, 1965). Participa do ciclo do carbono, produzindo diversas enzimas hidrolíticas e oxidativas, e tem a capacidade de degradar polímeros complexos de plantas, é oportunista em infecções humanas, sendo bastante utilizado na indústria biotecnológica, em processos de fermentação como na produção de ácido cítrico e tanase, sendo produtor da toxina ocratoxina A (PERFECT JR. et al., 2001; MAGNUSON J. et al., 2004; LEKHA et al., 1994; KLICH, 2002). Faz parte do grupo de *Aspergillus* pretos o qual é muito diversificado, e apenas abordagens fenotípicas não são suficientes para sua identificação sendo um forte candidato para manipulação genética (VARGA et al., 2011). Segundo Palacios-Cabrera et al., (2005) em seu trabalho constatou que *A. niger* entre *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, mostrou-se mais xerofílicos crescendo a temperaturas acima de 30°C, inclusive a 41°C em diferentes meios. Também foi observada a presença de *A. niger* em algumas marcas de chás de capim-limão, sem contudo apresentar a produção de aflatoxinas (GOMES et al., 2008).

Aspergillus aculeatus, normalmente encontrada em solo, foi descrito em trabalhos que envolvem a produção das enzimas hemicelulases, proteases e celulases utilizadas em indústrias alimentícias. Trabalhos envolvendo *A. aculeatus* na produção de xilanase e celulase utilizando como substrato cana-de-açúcar (SALES et al., 2010).

Aspergillus japonicus isolados de solo, plantas rizosfericas e serrapilheira citado em trabalhos no qual foi avaliada a atividade de pectinesterease, endo e exo-poligalacturonase (TEXEIRA et al 2000).

Aspergillus tamarii, primeiramente isolado de molho de soja japonês, comumente isolado de solo e sementes de varias culturas e em outros substratos (KLICH, 2002). É um bom produtor de amilase e glucoamilase, segundo Moreira, tendo como fonte de carbono, amido ou maltose (1999). Também é um promissor produtor de tanase segundo Costa et al., 2008.

Aspergillus terreus é amplamente distribuído no mundo e encontrado em solos, pastagens e isolados em culturas armazenadas (milho, cevada e amendoim). Produz

diversos tipos de metabolitos secundários como micotoxinas (patulina, citrininas, citreoviridina e gliotoxina) e drogas (lovastatina) (VARGA et al, 2005; BALAJEE, 2009). *A. terreus* é relacionado a infecções invasivas em pacientes imunocomprometidos, podendo causar onicomiose, IA - invasiva aspergilose (ABARCA, 2000; BALAJEE 2009). Segundo Baddley (2003) infecções causadas por *A. terreus* tem alta taxa de mortalidade em comparação a outros fungos dos gêneros.

2.4. *Aspergillus* Isolados de Ambiente Marinho

Segundo Antia et al., (2011), isolaram *Aspergillus aculeatus* de esponjas marinhas e baseando-se em seus estudos constaram que fungos marinhos crescem em meios contendo água salgada e não crescem facilmente em meio de cultivo sem o sal, como suplemento e, ainda os que conseguem crescer apresentam morfologia diferente.

Basheer et al., (2011) em sua pesquisa sobre produção da enzima lipase, concluiu que o gênero *Aspergillus* é um grupo marcante na produção de enzimas de interesse industrial. E o *A. awamori* BTMFW032 isolado de água do mar apresentou potencial para ser utilizado em biorremediação de óleo. Passarini et al., (2011) em seu trabalho constatou que *Aspergillus sclerotiorum* também isolado de ambiente marinho, do coral scleractinian *M. hispida* apresentou capacidade em degradar pireno e benzo[a]pireno, ambos PAH considerados recalcitrantes.

2.5. Biorremediação de Petroderivados por *Aspergillus*

O óleo diesel é um subproduto da destilação de petróleo bruto constituído basicamente de hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos (composto de átomos de carbono e hidrogênios), suas cadeias variam de 8 a 38 átomos de carbonos, e em concentrações menores: hidrogênio, enxofre e oxigênio (MAZZUCO, 2004). Os hidrocarbonetos são considerados indicadores de poluição por ser o componente mais abundante no petróleo, são classificados em quatro classes: aromáticos, alcanos, alcenos e cicloalcanos (SOUZA, 2009): hidrocarbonetos parafínicos ou alcanos são formados por cadeias carbônicas retas, tendo ou não ramificações e ligações simples; hidrocarbonetos aromáticos contém o núcleo benzênico, cadeia fechada com 6 átomos de carbono e ligações simples e duplas alternadas; hidrocarbonetos olefínicos ou alcenos são cadeias carbônicas insaturadas, com uma ou mais ligações duplas; os aromáticos são considerados

mais tóxicos e persistentes apresentando propriedades mutagênicas ou cancerígenas, os com dois ou mais anéis são denominados hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (SOUZA, 2009). Os HAPs são lipossolúveis, portanto são facilmente absorvidos por organismos como animais e seres humanos, podendo reagir com o DNA e causar alterações (JACQUES et al, 2007).

Acidentes envolvendo derramamentos ou vazamentos de óleo diesel no mar causam grandes danos à vida marinha, e a dificuldade em conter seu espalhamento nas superfícies das águas tem atraído a atenção de pesquisadores para estes eventos (GOMES, 2004). O período de permanência do contaminante no local depende de sua composição, das correntes marítimas e de outros fatores como fatores físicos (turbulência), químicos (fotodecomposição) e biológicos (biodegradação). Devido à reação que ocorre entre a composição complexa de sais, que estão presente em águas marinhas, e a composição química do petróleo e seus derivados podem formar compostos mais tóxicos e recalcitrantes (PEREIRA Jr et al., 2009).

Em novembro de 2011, a Petrobras detectou um vazamento de óleo (Figura 3) na plataforma de exploração SEDCO 706, operada pela Chevron, no Campo do Frade na Bacia de Campos no Rio de Janeiro. Este vazamento apresentou uma mancha de dimensão de cerca de 68 km de extensão, com cerca de 160 km² de área, a Agência Nacional de petróleo (ANP) estima que tenha vazado entre 200 e 330 barris/dia no período de 8 a 15 de novembro. Foi então criado um grupo de acompanhamento para fiscalizar as medidas tomadas pela Chevron Brasil Petróleo Ltda., para conter o vazamento (Assessoria de Imprensa da ANP, 2011).

Figura 3. Incidente ocorrido no Campo do Frade na Bacia de Campos no litoral de Rio de Janeiro – Chevron Brasil Petróleo Ltda.

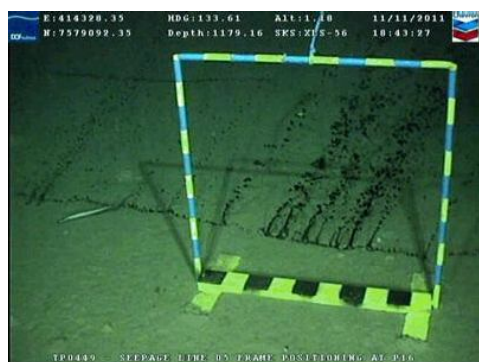


Foto 1 – Imagem da exsudação no dia 11NOV, captada por ROV

Esses acidentes vêm ocorrendo com mais frequência nas últimas décadas e isto mobilizou várias pesquisas em buscas de forma que possam minimizar os danos ao meio ambiente. São conhecidos vários métodos utilizados quando ocorre uma contaminação de solo e água em determinado ambiente, estes métodos podem ser físicos, químicos e biológicos. A biorremediação é um método biológico que tem mostrado resultados satisfatórios mediante os contaminantes.

Segundo Silva & Esposito (2010), biorremediação é a utilização de sistemas biológicos para recuperar a qualidade ambiental mediante a degradação dos poluentes. Neste processo ocorre a mineralização que é a transformação do poluente em dióxido de carbono e água, realizada por micro-organismos. Das reações de degradação de hidrocarbonetos aromáticos a do sistema enzimático intracelular citocromo P-450 monoxigenase é a mais estudada. Essa reação acontece primeiramente pela epoxidação de um dos anéis aromáticos catalisada pela citocromo P-450 monoxigenase formando um intermediário instável, um óxido de areno o qual é hidratado por uma epóxido hidrolase formando *trans*-diidrodiol e, por arranjos não enzimáticos, se formam fenóis (SUTHERLAND, 1992; BRINK et al., 1998).

As técnicas de biorremediação são divididas em *in situ* o qual a remediação ocorre no local onde houve a contaminação pela ação dos micro-organismos nativos e, *ex situ* - o material contaminado é removido e tratado em outro local (Tabela 4). Nas técnicas *in situ* são relatadas o bioaumento – é acrescentado micro-organismos exógenos ao local contaminado; bioestimulo – é adicionado nutrientes para estimular a ação dos micro-organismos nativos. Nas técnicas *ex situ* tem landfarming, compostagem, e biorreatores (JACQUES et al, 2007; GOMES, 2004).

A biodegradação é um processo natural que ocorre no próprio local, porém lento e incompleto, quando um contaminante entra em contato com a água do mar, por exemplo, podem sofrer vários processos físico-químicos e biológicos, a intensidade com que estes processos ocorrem varia ao longo do tempo. O petróleo e seus derivados têm, há décadas, contaminado o meio ambiente: solo, águas superficiais (dulcícola e marinha) e subterrâneas, devido ação humana. O refino, transporte e distribuição são meios pelos quais ocorrem contaminações do meio ambiente.

Tabela 4. Tipos de biorremediação

<i>In situ</i>	<i>Ex situ</i>
Bioaumento	Landfarming
Bioestímulo	Compostagem
	Biorreatores

Fontes: JACQUES et al, 2007; GOMES, 2004

Diversas espécies de fungos são utilizadas para degradar hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, sendo o gênero *Aspergillus* bastante representativo. O gênero *Aspergillus* em comparação a outros fungos como *Fusarium*, *Mucor*, e *Penicillium* tem sido visto como mais promissor na degradação de petróleo e óleo diesel, além de outros produtos de refinaria como gásóleo, querosene e gasolina, e hidrocarbonetos aromáticos como tolueno, p – xileno e etilbenzeno utilizando linhagens isoladas a partir de água do mar (VELIEV et al., 2008). O gênero *Aspergillus* também foi descrito como degradador de REYSOL, mistura hidrocarbônica, que tem uma composição semelhante a do querosene, pode ser aplicado em processos de biorremediação de água e solo contaminado por petróleo e petroderivados e apresenta efetividade na biodegradação de fenol até uma concentração de 989 ± 15 mg L- (MANAFI et al., 2012; PASSOS et al., 2009). Por exemplo, *A. sclerotiorum*, adaptado ao ambiente salino, sedimentos marinhos ou ao oceano foi descrito como um bom degradador de pyreno, um contaminante HAP (PASSARINI et al., 2011). Segundo YI et al (2011), o fungo *Neosartorya* sp., teleoformo de *Aspergillus* sp., apresentou potencial em remover mistura complexa de hidrocarbonetos e ainda mostrou bons resultados na remediação de água e solo contaminados por óleo. Concluindo que a linhagem BL4, *Neosartorya* sp., pode ser utilizado para cleanup de solo contaminado por hidrocarbonetos e compostos orgânicos. *Aspergillus fumigatus* alcançou um taxa de degradação mais elevada (61,29%) de octano, sugerindo que a população de fungos pode ser utilizada em processos de biorremediação de áreas poluídas por hidrocarbonetos de petróleo e metabólitos recalcitrantes (DHAR et al., 2012; LIU et al., 2011). *Aspergillus awamori* apresentou bons resultados na biodegradação de fenol, catecol e 2,4 – diclorofenol, e ainda isolados a partir da água do mar também apresentaram potencial para serem utilizados em indústrias devido a sua produção de lipase extracelular concluindo que a linhagem pode ser utilizada para biorremediação de compostos aromáticos e no tratamento de efluentes contaminados por óleos (STOILOVA et al., 2006; BASHEER et al., 2011). *Aspergillus niger* foi utilizado em estudo de degradação de hexadecano (VELASCO-ALVAREZ et al., 2011). E ainda, segundo Maruthi et al (2013), *A. niger*

junto com *Phanerocheate chrysosporium* foram capazes de degradar hidrocarbonetos em solos contaminados por petróleo, mostraram-se eficazes no processo de reciclagem de resíduos.

Maciel *et al* (2010) concluiu em seu trabalho que *Aspergillus tamari*, isolado ou em consórcio com *Penicillium griseofulvum* e *Cunninghamella elegans*, apresentou excelente potencial na degradação de lubrificantes automotivos antes e após a queima, o qual é utilizado em motores movidos a óleo diesel e a gasolina. *A. tamarii*, isolado ou em cultura mista com *P. purpurogenum*, também foi testado em experimentos com o objetivo de analisar a biodegradação de corantes recalcitrantes de efluentes têxteis, e apresentaram bons resultados na remoção do corante (RAMALINGAM *et al.*, 2010).

Aspergillus terreus mostrou-se eficiente na degradação de fluoreno e apresentou, junto com *A. fumigatus*, grande potencial para biodegradação de polietileno de baixa densidade (GARON *et al.*, 2000; ZAHRA *et al.*, 2010). *A. flavus* apresentou capacidade em degradar o corante azul Drimarene transformando-o em metabolitos não-toxicos e portanto considerado como promissor no tratamento de corantes contendo antraquinona presentes em efluentes têxteis (ANDLEEB *et al.*, 2012). Em um estudo sobre as características de bioissorção por *A. flavus*, os resultados mostraram que este fungo pode ser utilizado como bioissorvente de baixo custo e eficiente na remoção de íons Pb(II) e Cu(II) a partir de soluções aquosas (AKAR, T. & TUNALI, S., 2006). *A. ochraceus* foi um dos fungos utilizados em tratamentos de biorremediação, sendo eficaz em experimentos para tratar efluentes industriais têxteis através da bioissorção dos corantes presentes nos efluentes (ANASTASI *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos

As linhagens foram procedentes da água do mar e do Rio Ipojuca, próximo a instalações da empresa Termopernambuco S/A localizada no complexo portuário de Suape no município do Cabo de Santo Agostinho- PE (Figura 4). Foram mantidas em meio de cultura CZ – Czapek Dox solution Agar (DOX.1910).

Figura 4. Empresa Termope – Grupo Neo (08° 23' 45" S 34° 58' 04" O)



Fonte: <http://escadacom.wordpress.com/2011/09/page/9/>

3.2. Análise morfológica

As linhagens foram inoculadas nos meios de cultivo contendo as exigências nutricionais necessárias para produção de estruturas reprodutivas, como os meios: Agar extrato de levedura Czapek, segundo Pitt (1973), (CYA: K_2HPO_4 -1,0g; extrato de levedura- 5,0g; sacarose- 30,0g; Czapek concentrado- 10,0 ml; Agar- 15,0g; água destilada- 1L), Agar Extrato de Malte, segundo Blakeslee (1915), (MEA: Extrato de

malte- 20,0g; peptona- 1,0g; glicose- 20,0g; Agar- 15,0g; água destilada- 1L), Agar Czapek Dox, segundo Dox,1910, (CZ: K_2HPO_4 - 1,0g; Czapek concentrado- 10,0g; sacarose- 30,0g; Agar- 17,5g; água destilada- 1L), e semeadas em três pontos equidistantes a partir do centro da placa de Petri contendo os meios e incubada durante sete dias a 25°C. Após o período de incubação foram analisadas características macroscópicas como coloração do verso e reverso das colônias, diâmetro das colônias, presença ou ausência de exudato e pigmentos solúveis.

Para observação micromorfológica foram feitas lâminas a partir de colônias crescidas em MEA e CYA utilizando o corante Azul de Aman (Lactofenol de Aman). Foram observados os seguintes caracteres: seriação, vesícula, conídios, estipe, células Hulle, cleistotécio, esclerócios e ascósporos, utilizando o microscópio óptico.

3.3. Teste com o Indicador Redox 2,6 Diclorofenol-indofenol (DCPIP)

Foram testadas vinte e três linhagens de *Aspergillus* sp. para a primeira seleção de linhagens capazes de degradar óleo diesel segundo o método de Hanson et al., (1993). O teste consistiu em ensaios realizados em frascos Erlenmeyer (50 ml) contendo meio Bushnell Haas - BH, (1g de KH_2PO_4 ; 1g de K_2HPO_4 ; 1g de NH_4NO_3 ; 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05g de $FeCl_3$; 0,02g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, para 1000 mL); 2 blocos gelose com o inóculo; 500µl de óleo diesel e 500µl do indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol (DCPIP). O indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol atua comoceptor de elétrons na oxidação biológica promovendo mudança da cor azul para incolor. O teste inclui os controles bióticos, nos quais foi acrescentado 500µl de glicose (solução 10 g/ 1000 ml de água destilada) como fonte de carbono e, abióticos os quais consistem na ausência do inóculo.

3.4. Seleção de Linhagens para Otimização

Foram utilizadas para esta segunda seleção todas as linhagens que promoveram a viragem da coloração azul para incolor do indicador DCPIP em 24 horas no primeiro experimento de seleção. As linhagens repicadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo Czapek durante três dias foram inoculadas, três blocos de gelose contendo o fungo, em frascos Erlenmeyer contendo 50 ml do meio de cultivo caldo BH acrescidos de 5% de óleo diesel. Foram mantidas em estado estático e incubadas a 30° C por 10 dias. Experimento realizado em triplicata e adicionado do controle.

Após o período de incubação, o micélio foi separado do líquido metabólico por filtração. O micélio foi submetido à lavagem por três vezes em hexano, concentrado a seco e retomado em diclorometano, obtendo o primeiro extrato metabólico. E então, o micélio foi submetido à secagem em estufa a 40°C por 24 horas para avaliar o peso seco do material. E o líquido metabólico submetido à extração dos subprodutos do óleo diesel utilizando o solvente diclorometano. Uma alíquota deste produto foi analisada em cromatógrafo gasoso – CG-MS.

O cromatógrafo utilizado para este experimento foi o modelo Shimadzu™ 17A/QP 5050A na temperatura de injeção e de interface de 290°C, e a coluna cromatográfica OV-5 (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30m x 0,25 µm. A temperatura foi programada para variar linearmente de 40°C a cada 4 minutos e 290°C por 8 minutos com taxa de aquecimento de 4°C min⁻¹, o volume injetado foi de 1 µL, com split de 1:98 e fluxo de gás hélio de 1 mLmin⁻¹.

Para a identificação dos hidrocarbonetos alifáticos foi realizada a comparação dos espectros de massa dos compostos do óleo diesel com os da Biblioteca de Compostos Wiley™. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de massa com ionização elétrica e detector do tipo Multiplicador Secundário de Elétrons (70EV) que operou em temperatura de fonte de íons de 290°C e varredura de 35m/z a 500m/z.

3.5. Otimização e Planejamento Experimental

As linhagens selecionadas como descrito no item 3.4. foram submetidas a um planejamento experimental Delineamento Composto Central (DCC) com três variáveis 2³ mais 3 pontos centrais conforme tabela 5, com a finalidade de otimizar as condições nutricionais do meio utilizado no processo. As variáveis utilizadas no processo foram a concentração do nitrogênio (N), do fósforo (P) e do magnésio (Mg), moléculas utilizadas em reações enzimáticas. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral BH (Bushnell Haas), 3 blocos de gelose com o inóculo e concentrações de 5% de óleo diesel e incubados a 28±2°C, sob condição estática por até cinco dias.

A biodegradabilidade dos ensaios de otimização foi evidenciada mediante a extração dos subprodutos do tratamento e analisadas de acordo com a metodologia de Miranda *et al.*, (2007) através da comparação entre os picos dos compostos observados no controle e

os picos observados nos ensaios de otimização. Foram retiradas alíquotas de cada ensaio e extraídas com solvente diclorometano e suas fases foram separadas em funil de separação e posteriormente injetadas no cromatógrafo gasoso (CG).

Tabela 5. Matriz do Planejamento Fatorial

Ensaio	Fonte de Nitrogênio (NH ₄ NO ₃)	Fonte de Fósforo (KH ₂ PO ₄)	Fonte de Magnésio (MgSO ₄)
1	1g (-1)	1g (-1)	0,2g (-1)
2	2g (1)	1g (-1)	0,2 (-1)
3	1g (-1)	2g (1)	0,2g (-1)
4	2g (1)	2g (1)	0,2g (-1)
5	1g (-1)	1g (-1)	0,4 (1)
6	2g (1)	1g (-1)	0,4g (1)
7	1g (-1)	2g (1)	0,4g (1)
8	2g (1)	2g (1)	0,4g (1)
9 (C)	1,5g (0)	1,5g (0)	0,3g (0)
10 (C)	1,5g (0)	1,5g (0)	0,3g (0)
11 (C)	1,5g (0)	1,5g (0)	0,3g (0)

3.6. Toxicidade

A fim de monitorar os efeitos fitotóxicos do biotratamento de ambiente contaminados por óleo diesel, os subprodutos provenientes do biotratamento citado no item 3.5. foram submetidos ao teste de fitotoxicidade com sementes de pepino caipira (*Cucumis sativus* L.), o qual consistiu na constatação de germinação e em medições de crescimento de raiz de acordo com metodologia empregada por Tiquia et al., (1996). O teste consistiu em por 10 sementes em placas de Petri contendo papel de filtro duplo embebido em 2 mL de do subproduto do biotratamento e incubadas por 5 dias a ($\pm$ 28°C), em triplicata.

Também foram acrescentadas dois controles, um positivo com água destilada e outro negativo com óleo diesel. Após o período de incubação foram analisadas a porcentagem de germinação e o índice de germinação das sementes utilizando a fórmula:

$\text{Porcentagem relativa de germinação (\%G)} = \frac{\text{Média de sementes germinadas}}{\text{Média da semente germinadas no controle} \times 100}$	$\text{Crescimento médio da raiz (\%CMR)} = \frac{\text{Média do crescimento da raiz}}{\text{Média de crescimento da raiz do controle} \times 100}$
---	---

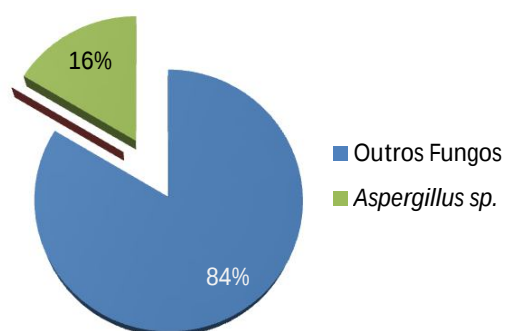
$\text{Índice de germinação (\%IG)} = \frac{\% \text{ Germinação da semente} \times \% \text{ Crescimento da raiz}}{100}$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de Linhagens por Caracterização Morfológica

Após a identificação para constatação de linhagens de fungos filamentos procedentes de água do mar, foram confirmadas 140 linhagens fúngicas das quais 23 linhagens pertencem ao gênero *Aspergillus* (Gráfico 1, Tabela 6,7). Das 23 linhagens, oito são da espécie *Aspergillus aculeatus* – AAC (Figura 5), três de *Aspergillus japonicus* -AJA, seis de *Aspergillus flavus* -AFL (Figura 6), dois de *Aspergillus awamori* - AAW, dois de *Aspergillus niger* –ANI (Figura 7), um de *Aspergillus terreus*- ATE (Figura 8) e um de *Aspergillus tamarii*- ATA. Santos (2010) pesquisou o potencial de ecossistemas marinhos em aplicações biotecnológicas, avaliou a diversidade de fungos de derivados marinhos e seu potencial na biorremediação de poluentes ambientais. Gomes *et al.*,(2008) pesquisaram a diversidade de fungos em ambientes marinhos em água e solo das praias de Casa Amarela e Bairro Novo, Olinda-PE, e dentre os 20 gêneros isolados, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. janus*, *A. japonicas*, *A. niger* *A. sydowii*, *A. terreus* foram alguns representantes de *Aspergillus*.

Gráfico 1. Linhagens de fungos filamentosos isolados de águas do porto de Suape-PE.

Tabela 6. Espécies de *Aspergillus* spp. procedentes da água do mar e do rio Ipojuca, localizada no complexo portuário de Suape no município do Cabo de Santo Agostinho.

Quantidade	Espécie	Procedência	
		Mar	Rio Ipojuca
8	<i>Aspergillus aculeatus</i>	AAC03, AAC07, AAC08, AAC38, AAC39, AAC77, AAC80, AAC90	-
6	<i>Aspergillus flavus</i>	AFL10, AFL13, AFL35, AFL46, AFL59,	AFL102
3	<i>Aspergillus japonicus</i>	AJA04, AJA85, AJA95	-
2	<i>Aspergillus awamori</i>	AAW20, AWA74	-
1	<i>Aspergillus terreus</i>	-	ATE103
2	<i>Aspergillus niger</i>	ANI44	ANI107
1	<i>Aspergillus tamarii</i>	-	ATA122

Figura 5. *Aspergillus aculeatus* após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (A- Reverso, B- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (C- Reverso, D- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (E- Reverso, F- Verso).

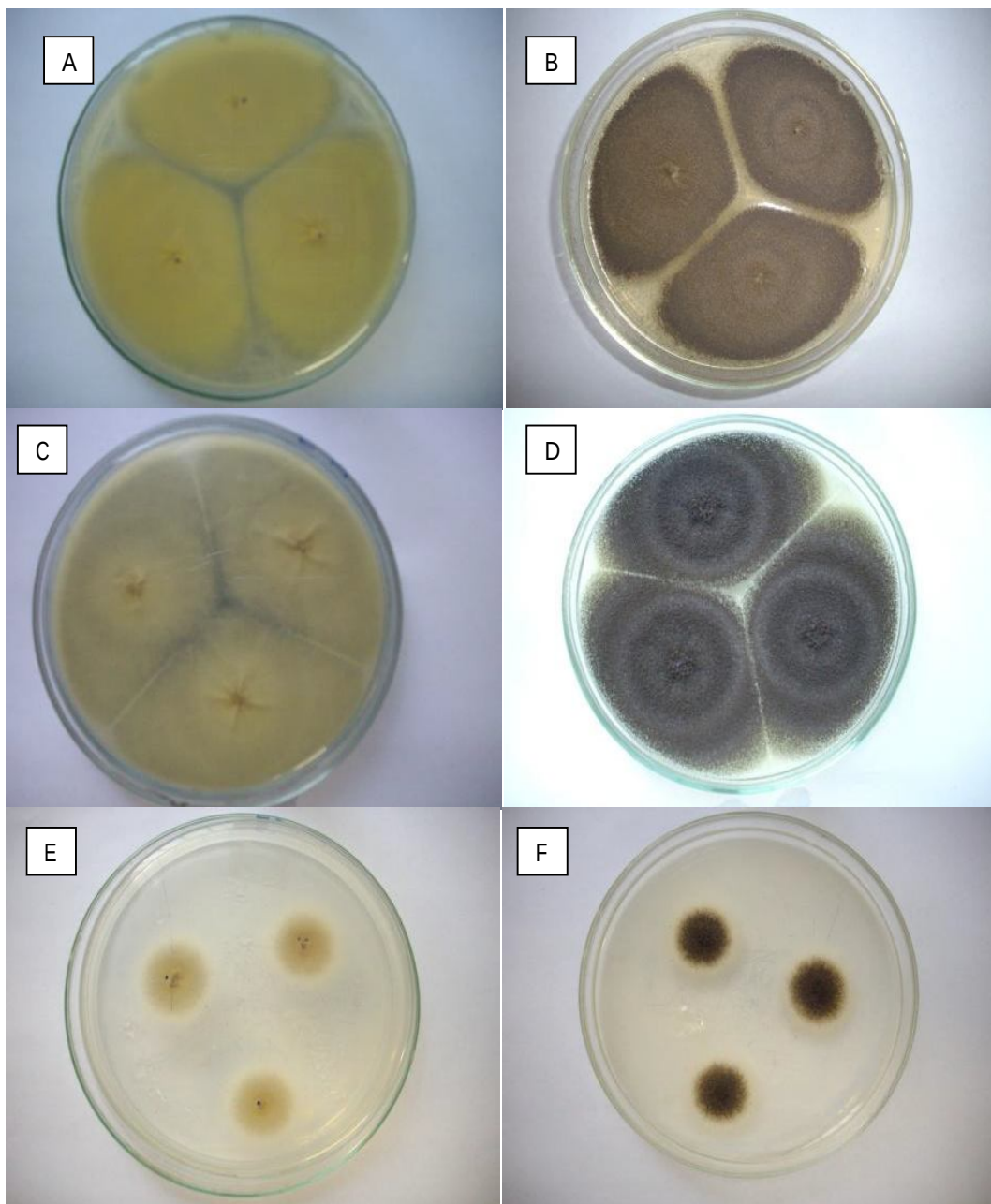


Figura 6 . *Aspergillus flavus* após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (L- Reverso, K- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (J- Reverso, I- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (H- Reverso, G

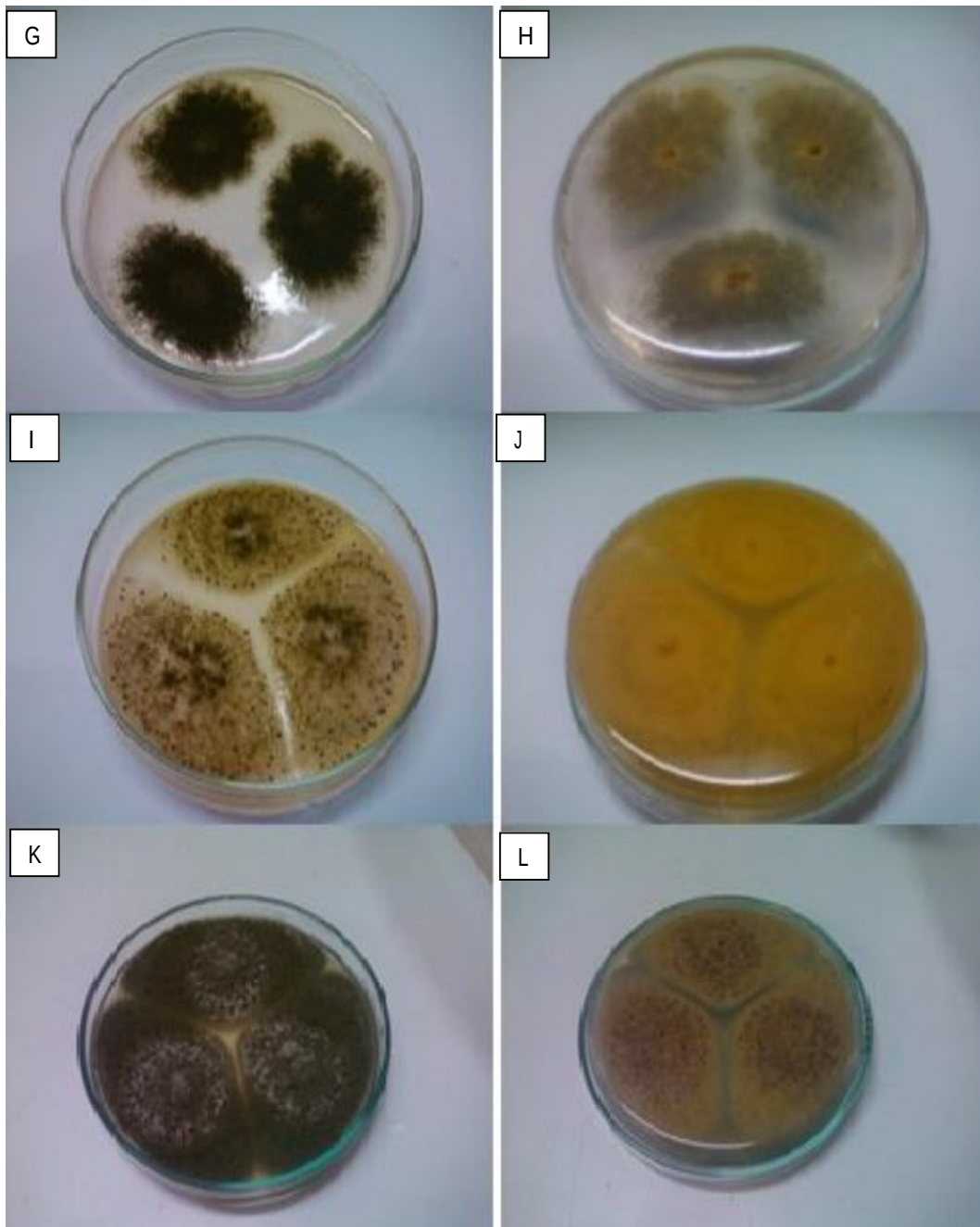


Figura 7. *Aspergillus niger* após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (R- Reverso, Q- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (P- Reverso, O- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (N- Reverso, M- Verso)

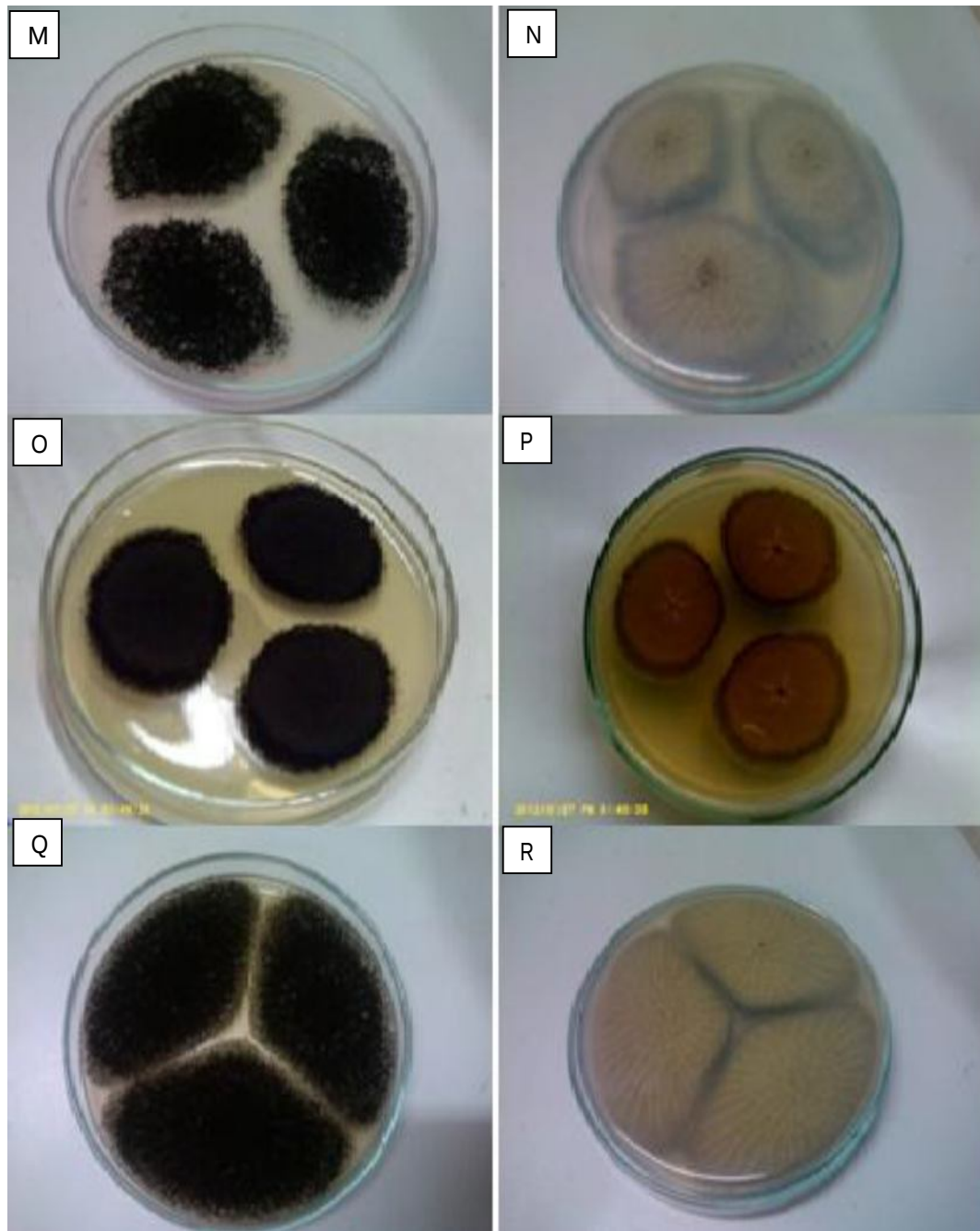


Figura 8. *Aspergillus terreus* após sete dias de crescimento a 25°C nos meios de cultura Agar extrato de levedura (CYA) (W- Reverso, X- Verso); Agar extrato de Malte (MEA) (V- Reverso, U- Verso) e Agar Czapek dox (CZ) (T- Reverso, S- Verso).

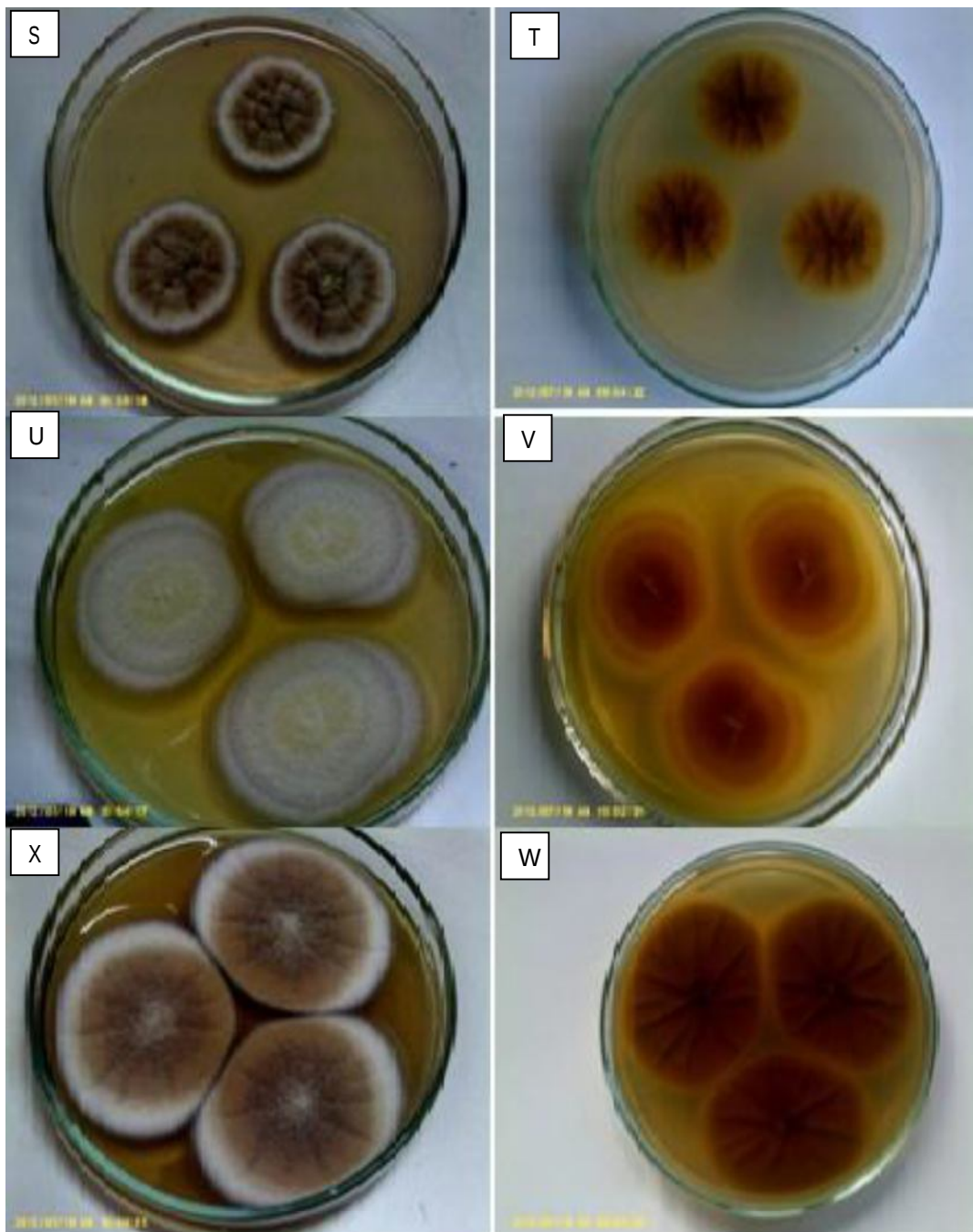


Tabela 7. Caracterização fenotípica das linhagens *Aspergillus*

Linhagem	Cor da Colônia			Serição	Diâmetro da Colônia			Conidio		Vesícula				
	CYA	CZ	MEA		CYA	CZ	MEA	Forma	Textura	Forma	Tamanho			
<i>Aspergillus flavus</i>	ve	a/v	a/v	u	106	78	101	Gl	fr	pi	17,5 µm			
<i>Aspergillus aculeatus</i>	pr	pr	am	u	75-80	65-70	40/55	gl/el	r	gl/pir	54 µm			
<i>Aspergillus terreus</i>	ma	ma	ma	b	45	27	41	Gl	l	pi	9 µm			
<i>Aspergillus tamari</i>	ve	ve	ve	u	90	95	95	Gl	r	pi/gl	16 µm			
<i>Aspergillus awamori</i>	pr	pr	pr	b	55	60	60	Gl	fr	gl	20 µm			
<i>Aspergillus japonicas</i>	pr	pr	ma	u	75	65	55	gl/el	r	gl	30 µm			
<i>Aspergillus niger</i>	pr	pr	pr	u/b	105	99	71	Gl	r	gl	103 µm			
	Reverso			Exudato			Cleist/escler			Pigmento solúvel			Estipe	
	C Y A	C Z	M E A	C Y A	C Z	M E A	C Y A	C Z	M E A	C A	Y Z	M A	Textura	Tamanho
<i>Aspergillus flavus</i>	ma	ve	ve	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	r	579-650 µm
<i>Aspergillus aculeatus</i>	ma	a/v	am	-	-	-	-	-	-	-	-	-	l/p	600 µm
<i>Aspergillus terreus</i>	ma	bg	ma	+	+	-	-	-	-	-	-	-	l	169 µm
<i>Aspergillus tamari</i>	ma	Ma/ve	Ma/ve	-	-	-	-	-	-	-	-	-	fr	50-110 µm
<i>Aspergillus awamori</i>	ma	cz	cz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	fr	300-1100 µm
<i>Aspergillus japonicas</i>	Ve/ma	Ve/ma	ve	-	-	-	-	-	-	-	-	-	l	400 µm
<i>Aspergillus niger</i>	bg	a/v	a/v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	l	900µm

Legenda: 25°C, 7 dias de incubação, diâmetro da colônia-mm.

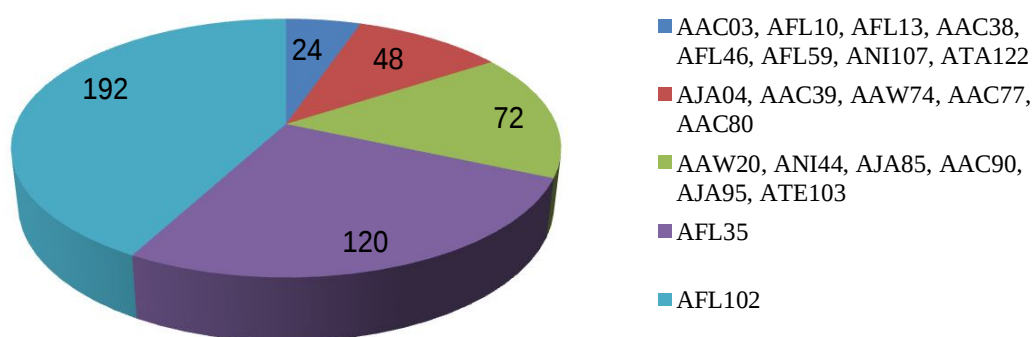
u = unisseriado; b = bisseriado; gl = globoso; el = elíptico; l = liso; fr = finamente rugoso; r = rugoso.

pr-preto; ve-verde; am-amarelo; ma- marron; a/v- amarelo/verde; p- pigmentada; gl-globosa; pi-piriforme; esp-espatulada; cl-clavada; p/b-preto/branco; cz-cinza; bg-bege

4.2. Teste de Seleção com Indicador Redox 2,6 Diclorofenol Indofenol

As linhagens foram submetidas ao teste de seleção com DCPIP, de acordo com o método de Hanson et al., (1993) para selecionar linhagens que promoveram oxidação biológica do indicador em menor período de tempo, o que é representado pela mudança da coloração azul para incolor (Figura 9). A figura 9 ilustra, em sequência, o controle negativo (sem a presença de inóculo), controle positivo (tendo como fonte de carbono solução glicosada) seguidos de três ensaios contendo como fonte de carbono o óleo diesel. Das vinte e três linhagens de *Aspergillus* sp. testadas (Gráfico 2) oito viraram o corante em 24 horas, cinco viraram em 48 horas, seis em 72 horas, uma em 120 horas e uma em 192 horas. Duas linhagens não viraram o corante. A viragem em 24hs foi representada pelas espécies *A. flavus* (AFL10, AFL13, AFL46 e AFL59), *A. aculeatus* (AAC03), *A. niger* (ANI107) e *A. tamarii* (ATA122). A viragem do corante (figura 9) em 48hs foi realizada pelas espécies *A. japonicus* (AJA04), *A. aculeatus* (AAC39, AAC77, AAC80) e *A. awamori* (AAW74). A viragem em 72hs foi realizada pelas espécies *A. awamori* (AAW20), *A. niger* (ANI44), *A. japonicus* (AJA85, AJA95), *A. aculeatus* (AAC90) e *A. terreus* (ATE103). A linhagem AFL35, um *A. flavus* promoveu a viragem em 72hs e o AFL102, também *A. flavus* foi 192hs. No trabalho de Maciel et al., (2010) *A. tamarii* tanto isolado como em consórcio mostrou bons resultados na degradação de lubrificantes automotivos limpos e usados.

Gráfico 2. Resultados do teste da seleção de DCPIP. Tempo de viragem em horas



Legenda: *A. flavus* – AFL10, AFL13, AFL35, AFL46, AFL59, AFL102; *A. aculeatus* – AAC03, AAC38, AAC39, AAC77, AAC80, AAC90; *A. japonicus* – AJA04, AJA85, AJA95; *A. awamori* – AWA20, AWA74; *A. tamarii* – ATA122; *A. niger* – ANI44, ANI107; *A. terreus* – ATE103.

Figura 9. Viragem do corante DCPIP. Por diferentes espécies de *Aspergillus* com 24, 48 e 72 horas A- *Aspergillus flavus*, 24 hs; B- *Aspergillus aculeatus*, 48 hs; C- *Aspergillus japonicus*, 72 hs. Legenda: 1 – controle negativo; 2 – controle positivo; 3, 4, 5 – tratamento com óleo diesel.



4.3. Seleção para Definir a Linhagem para Otimização

O ensaio de degradação da linhagem *A. aculeatus* (AAC03) apresentou picos inferiores a 30% de degradação de óleo diesel com pH entre 6 e 7 e produção de biomassa inferior a 0,02g (Fig.10). A linhagem *A. aculeatus* (AAC38) obteve degradação inferior a 45%, pH entre 6 e 7 e biomassa abaixo de 0,02g (Fig. 13). A linhagem *A. niger* (ANI107) apresentou resultados de degradação abaixo de 30% (Fig. 16), pH entre 6 e 7 e crescimento micelial inferior a 0,02g. As duas linhagens de *Aspergillus aculeatus* e a de *Aspergillus niger*, pertencentes a secção Nigri, apresentaram um padrão em relação ao pH e biomassa, e quanto a degradação obtiveram valores também próximos, ou seja, abaixo de 45%.

A linhagem *A. flavus* (AFL10) apresentou níveis de degradação abaixo de 40% acompanhado do pH do líquido metabólico abaixo de 4 e uma biomassa inferior a 0,14g (Fig.11). A linhagem AFL13 também um *A. flavus* abaixo de 45%, pH inferior a 4 e um crescimento de biomassa inferior a 0,1g (Fig.11). Na figura 14 mostra a porcentagem de degradação da linhagem *A. flavus* (AFL46), o qual foi inferior a 35% com pH abaixo de 4 e biomassa próxima de 0,1g. Na figura 15 apresenta a degradação da linhagem *A. flavus* (AFL59) com picos que chegaram em torno de 80% e pH próximo a 3 e biomassa entre 0,12g e 0,14g. E na figura 17 é apresentado a degradação da linhagem *A. tamarii* (AFL122) que foi abaixo de 50%, pH entre 5 e 6 e biomassa 0,07g.

Como visto nos resultados todas as linhagens pertencentes à espécie *Aspergillus flavus* tiveram um padrão quanto ao pH que todos entre 3 e 4 e crescimento micelial entre 0,09g e 0,14g, porém a degradação houve uma diferença significativa para a linhagem AFL59 que teve picos próximos a 80% enquanto que as outras linhagens não passaram de 45%. *A. flavus* e *A. tamarii*, ambos da secção Flavi, não seguiram um padrão nos resultados de pH e biomassa. *A. flavus* apresentou padrão em relação a pH e biomassa diferente de *A. tamarii* que apresentou resultados diferentes tanto os de *A. flavus* quanto os das linhagens de *A. aculeatus* e *A. niger*.

Figura 10. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus aculeatus* (AAC03) na porcentagem de 5%.

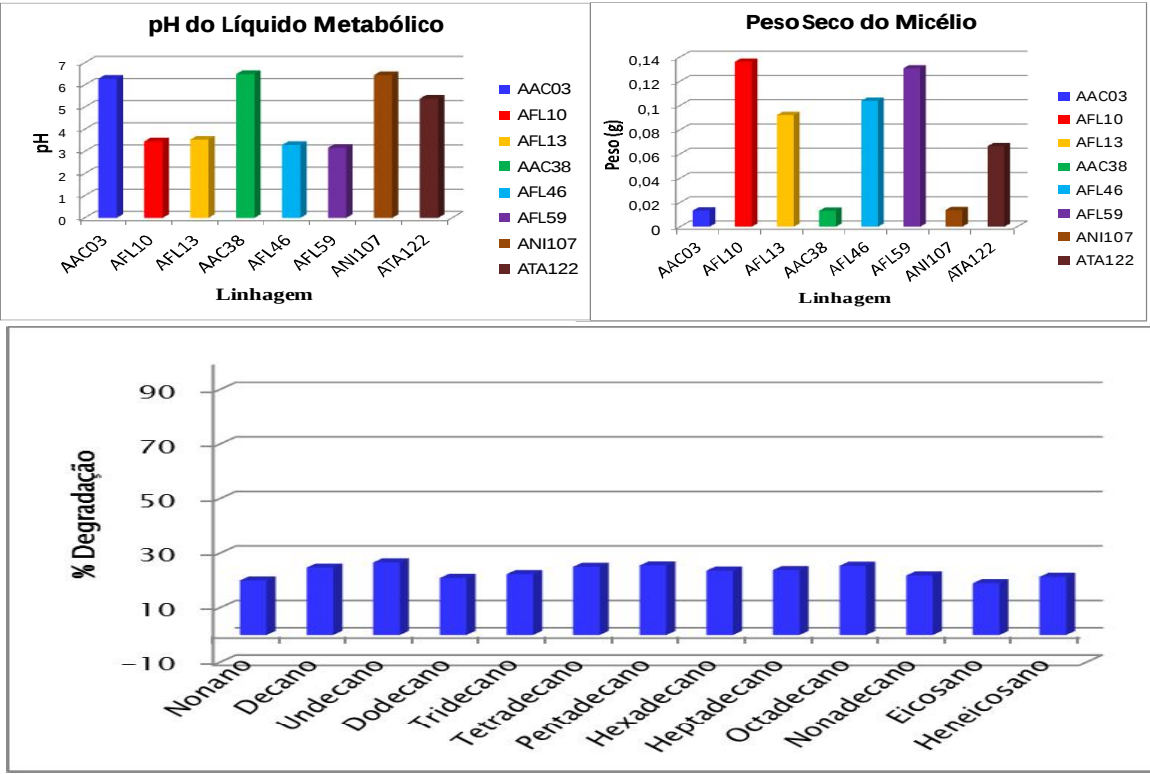


Figura 11. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus flavus* (AFL10) na porcentagem de 5%.

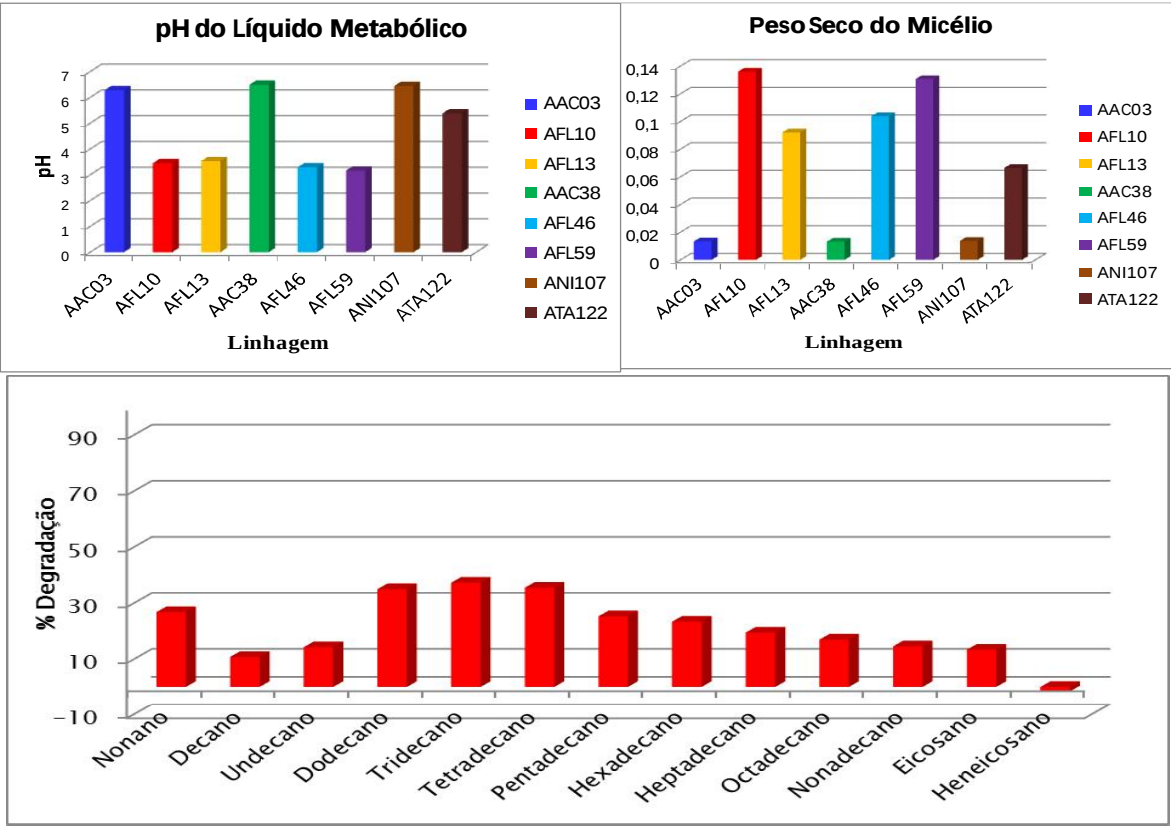


Figura 12. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus flavus* (AFL13) na porcentagem de 5%.

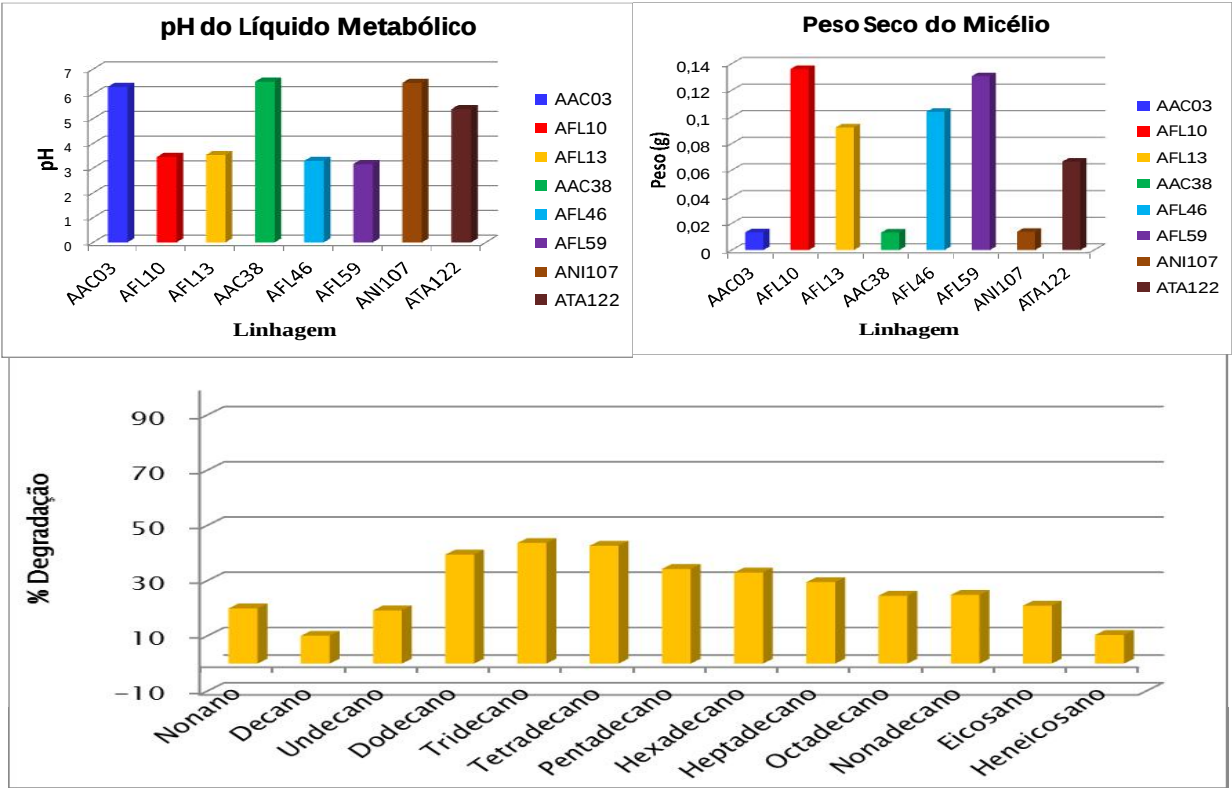


Figura 13. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus aculeatus* (AAC38) na porcentagem de 5%.

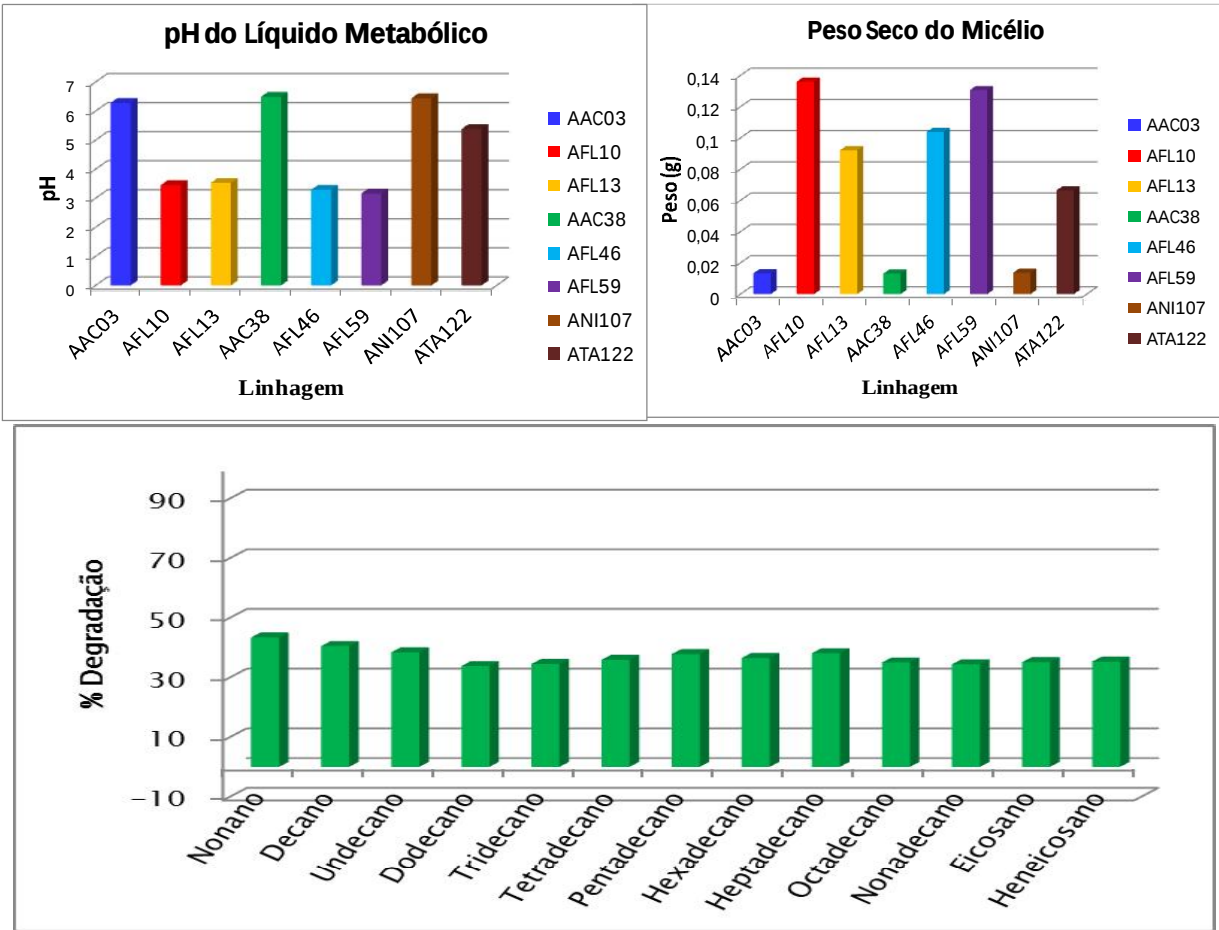


Figura 14. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus flavus* (AFL46) na porcentagem de 5%.

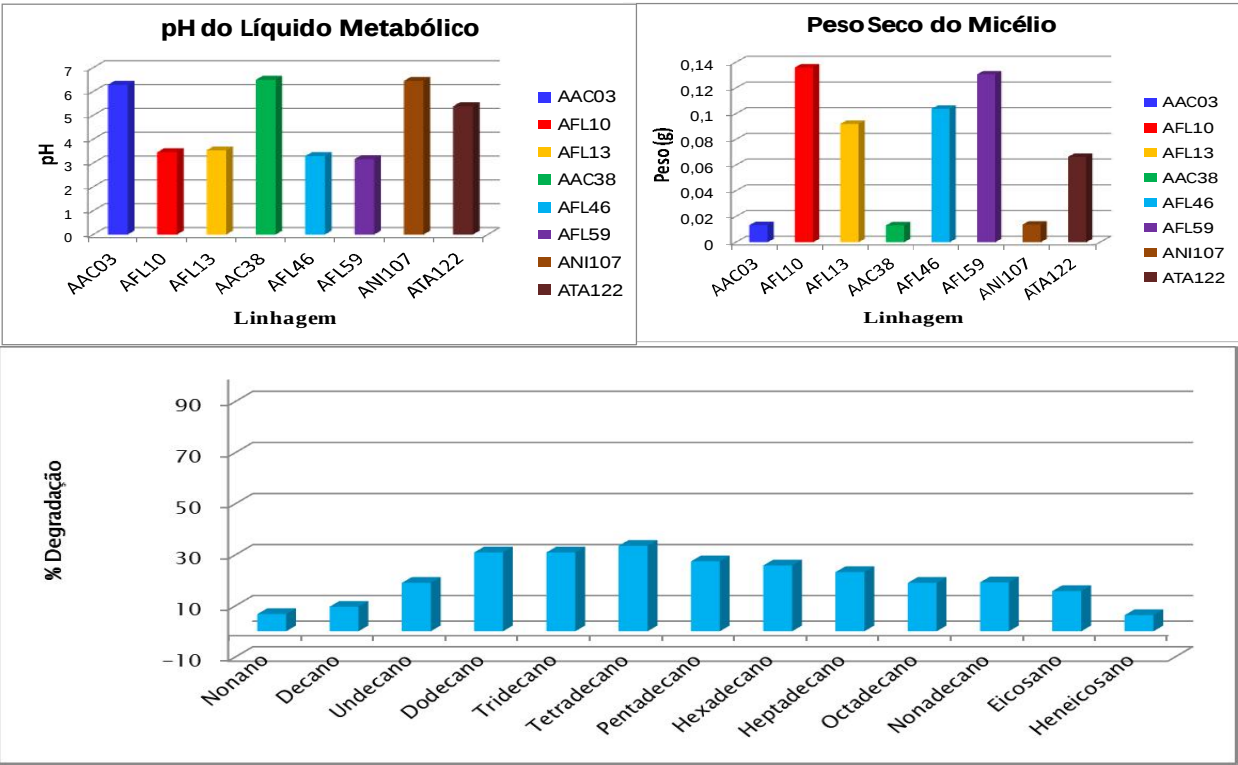


Figura 15. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus flavus* (AFL59) na porcentagem de 5%.

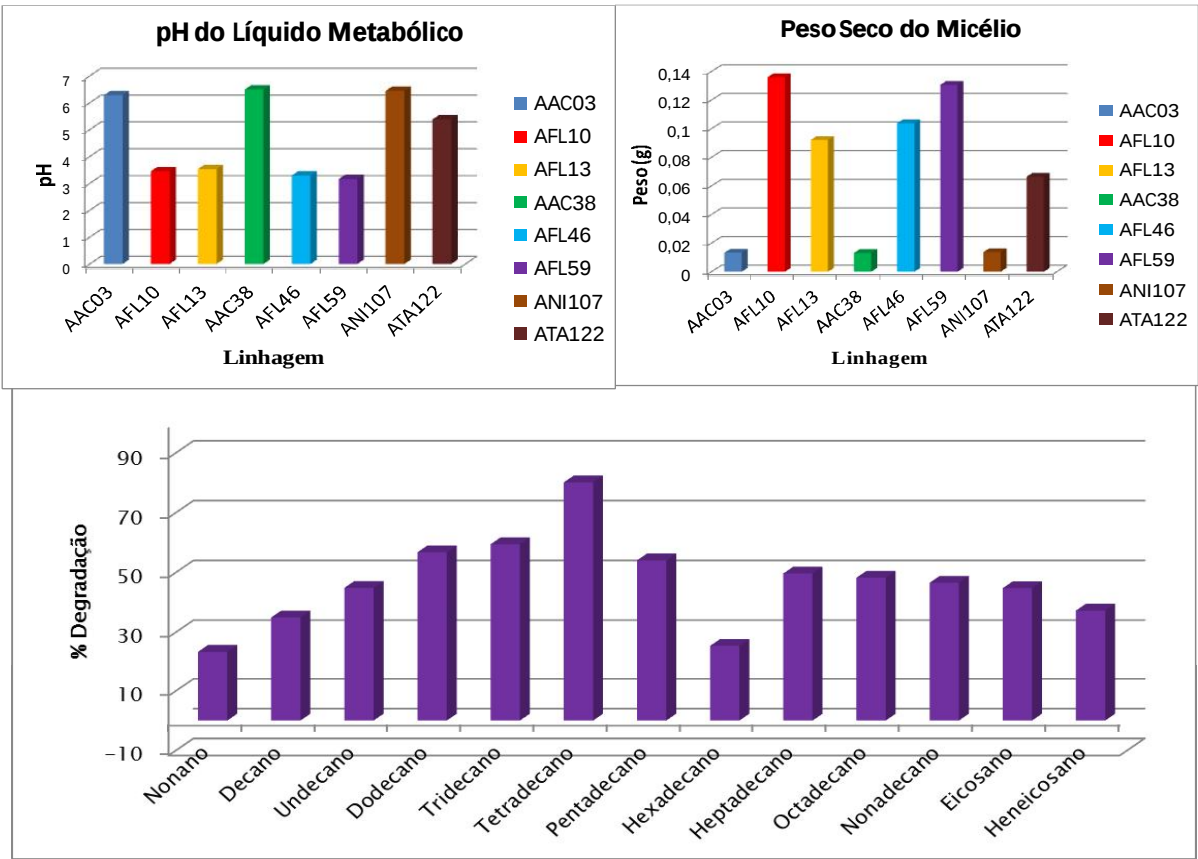


Figura 16. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus niger* (ANI07)na porcentagem de 5%.

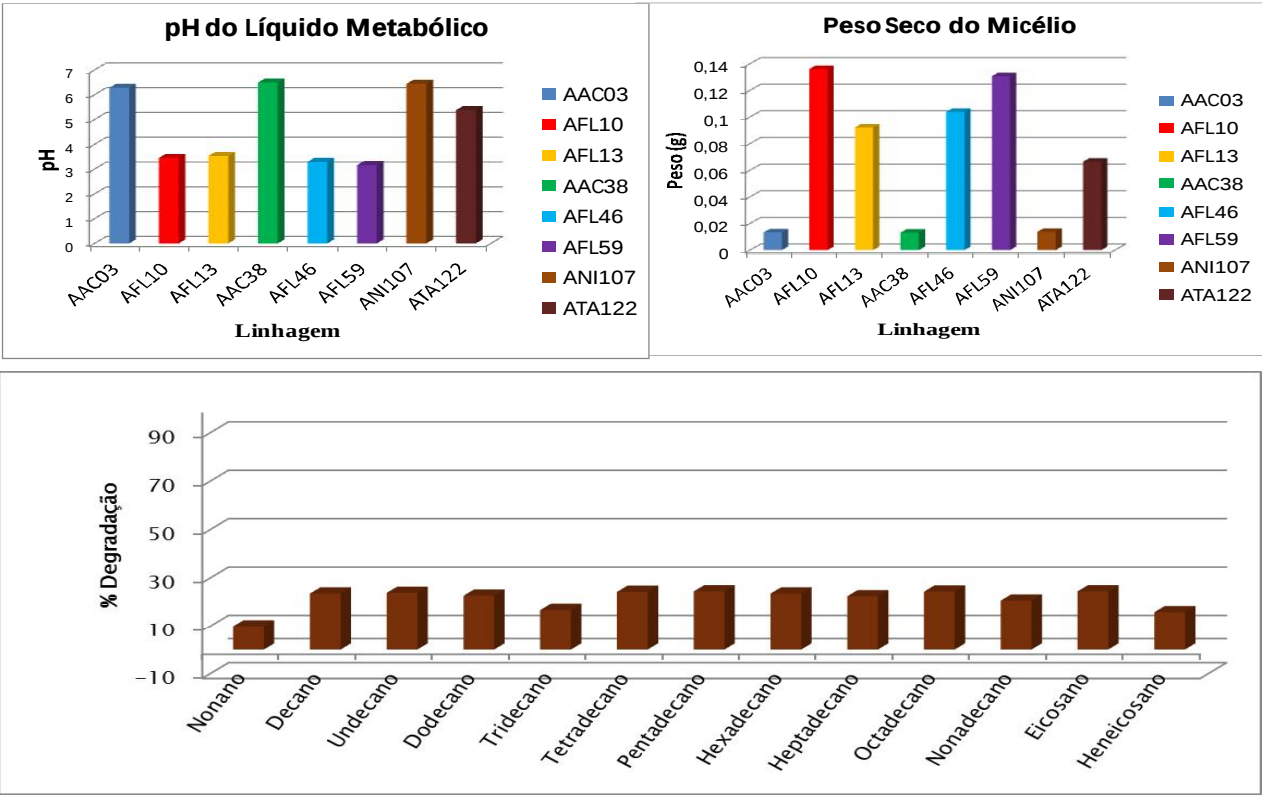
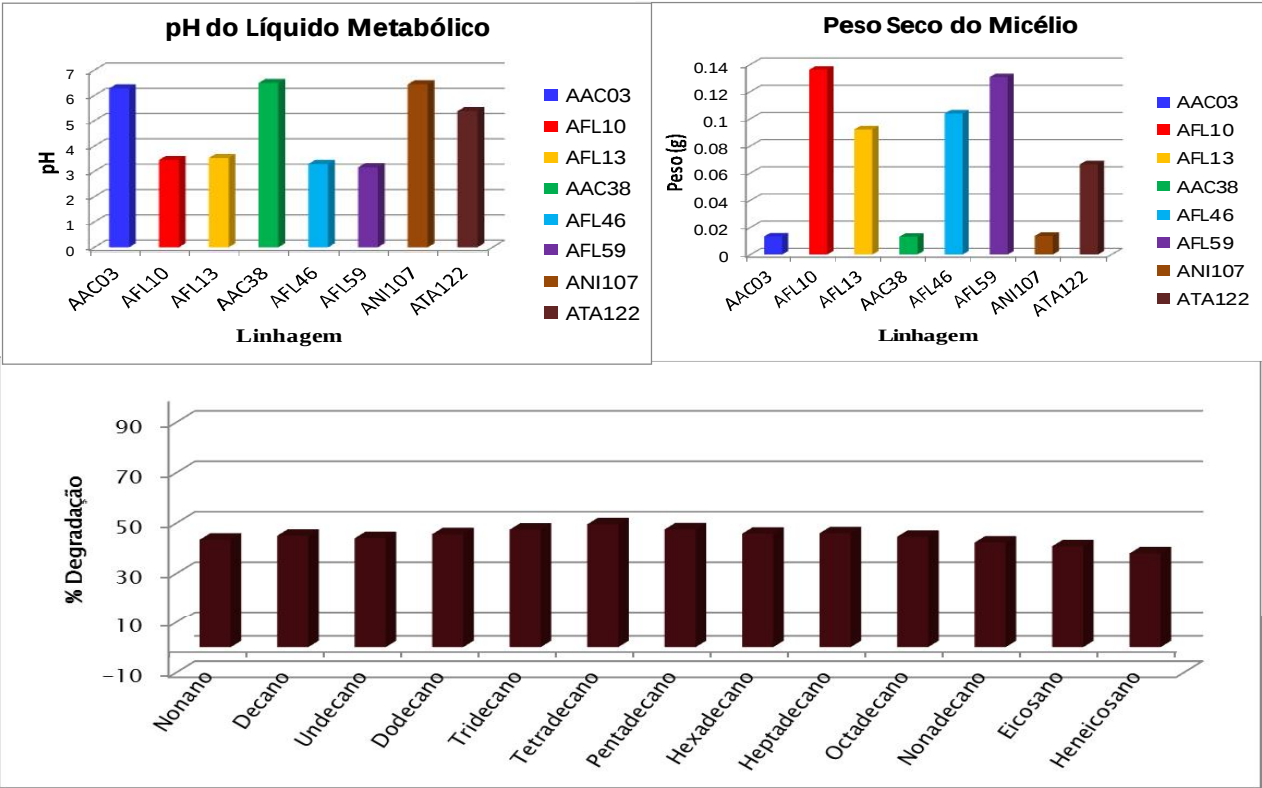


Figura 17. Degradação de óleo diesel por *Aspergillus tamarii* (ATA122)na porcentagem de 5%.



4.4. Otimização

Com base no experimento de seleção no subitem 4.3. foi selecionada a linhagem de *Aspergillus flavus* - AFL59 para o experimento de otimização, neste experimento foram realizados 11 ensaios cujas variáveis foram N (NH_4NO_3), P (KH_2PO_4) e Mg (MgSO_4). Após extração dos subprodutos do biotratamento e injetadas alíquotas em cromatógrafo gasoso (GC) foram analisadas 13 cadeias de hidrocarbonetos mais evidentes presentes no óleo diesel. Para a análise é feita uma comparação entre os picos dos compostos observados no controle e os picos observados nos ensaios de otimização (ROSATO, 1997). Estudos sobre biorremediação de solos contaminados por óleos derivados do petróleo com os fungos *Phanerocheate chrysosporium* e *Aspergillus niger* mostraram serem eficazes agentes de biodegradação desses hidrocarbonetos (MARUTHI et al., 2013).

A eficiência de degradação (E.D%) de óleo diesel dos ensaios apresentou porcentagem próximo a 100% para o hidrocarboneto nonano, com exceção do ensaio quatro que foi 43,63%, entre decano e hexadecano não apresentou picos de degradação e a partir heptadecano até heneicosano apresentaram picos de degradação com as maiores porcentagens de 20,85% para heptadecano no ensaio 05, de 21,8%, para octadecano, de 27,44%, para nonadecano e de 27,76%, para heneicosano, os três no ensaio 7 e de 37,11% para heneicosano no ensaio 10 (gráfico 3). Volke-Sepulveda et al. (2006) constatou em seu trabalho que o hexadecano, um hidrocarboneto alifático presente no óleo diesel, foi completamente degradado por *A. niger* ATCC-9642 em concentrações elevadas. A levedura *Rhodospiridium tiruloides* apresentou resultados satisfatórios em trabalhos de biorremediação mostrando ter potencial na degradação de óleo diesel (KUMARI et al., 2011).

A ausência de picos das cadeias carbônicas entre decano (C10) e hexadecano (C16) possivelmente foi devido à quebra das cadeias carbônicas maiores, entre heptadecano (C17) e heneicosano (C21), aumentado à concentração de cadeias entre decano (C10) e hexadecano (C16). Também foi observado que os ensaios cinco e dez, além da degradação do nonano em torno de 100%, apresentaram os melhores percentuais de eficiência de degradação das cadeias de heneicosano (C21). Miranda et al. (2007) investigaram a degradação de hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo diesel por levedura *R. Aurantiaca* (UFPEDA 845) e *C. ernobii* (UFPEDA 862), a primeira linhagem apresentou maior degradação para decano, nonano e dodecano (93,0%, 38,4% e 22,9%, respectivamente), já a segunda alcançou completa degradação para tetradecano, 5-metil-octano e octadecano, e parcial degradação para decano,

4.5. Toxicidade

Os resultados dos testes de fitotoxicidade dos ensaios de otimização na concentração de 5% de óleo diesel mostraram-se satisfatórios, utilizando a linhagem *Aspergillus flavus* – AFL59 (gráficos 4, 5 e 6). Os ensaios de otimização utilizando o planejamento experimental Delineamento Composto Central com onze ensaios apresentaram o menor índice de germinação de 43,6% e o maior de 98,4% (tabela 8; 9) em comparação com o controle positivo, demonstrando que o resíduo proveniente do tratamento de otimização não foram tóxicos. Nos ensaios de fitotoxicidade nas placas de controle com óleo diesel, as sementes não apresentaram germinação, o que comprova a toxicidade dos petroderivados (fig.18). Nas placas de controle com água destilada apresentaram crescimento de todas as sementes (figura 18).

Segundo Rivera-Cruz & Trujillo-Narcia (2004), crescimento vegetal reduzido, germinação inibida e morte vegetal indicam o grau de toxicidade de poluentes. Segundo Baek et al. (2004) o crescimento de raízes de milho foi levemente reduzido em solo contaminado com concentrações elevadas de hidrocarbonetos alifáticos C20.

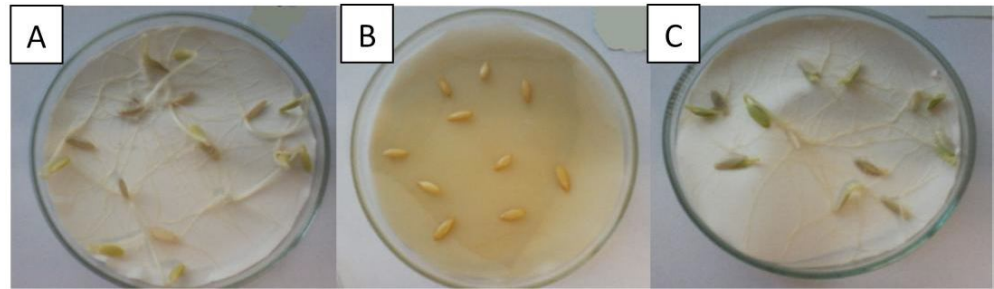


Figura 18. A – Controle positivo; B – Controle negativo; C – Tratamento com resíduo.

Tabela 8. Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com óleo Diesel.

TESTE DE FITOTOXICIDADE-ÓLEO DIESEL								
Parâmetros	1	2	3	4	5	6	C(+)	C(-)
%G	100%	100%	96%	93%	96%	100%	100%	0%
%CR	70,20%	81,60%	80,40%	66,20%	51,30%	70,10%	100%	0%
IG	70,20%	81,60%	77,10%	61,50%	49,20%	70,10%	100%	0%

Tabela 9. Resultados dos ensaios de fitotoxicidade com óleo Diesel.

TESTE DE FITOTOXICIDADE-ÓLEO DIESEL							
Parâmetros	7	8	9	10	11	C(+)	C(-)
%G	100%	100%	100%	100%	96%	100%	0%
%CR	89,60%	80,40%	89,60%	90,80%	82,70%	100%	0%
IG	89,60%	80,40%	89,60%	90,80%	79,39%	100%	0%

Gráfico 4. Desvio padrão e média do índice de crescimento das raízes do teste fitotoxicidade.

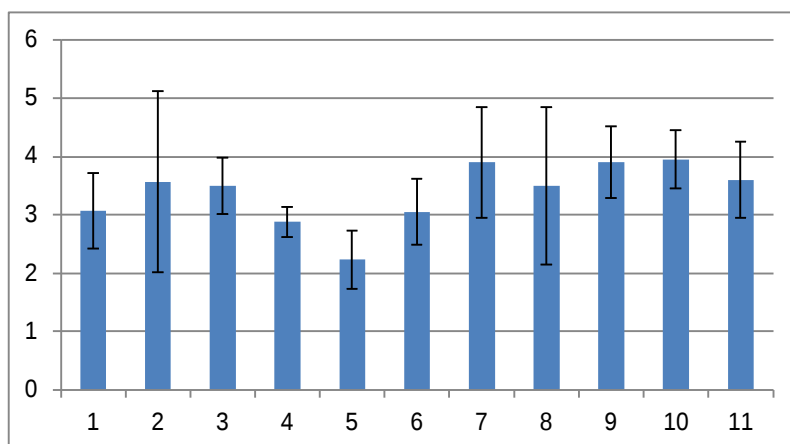
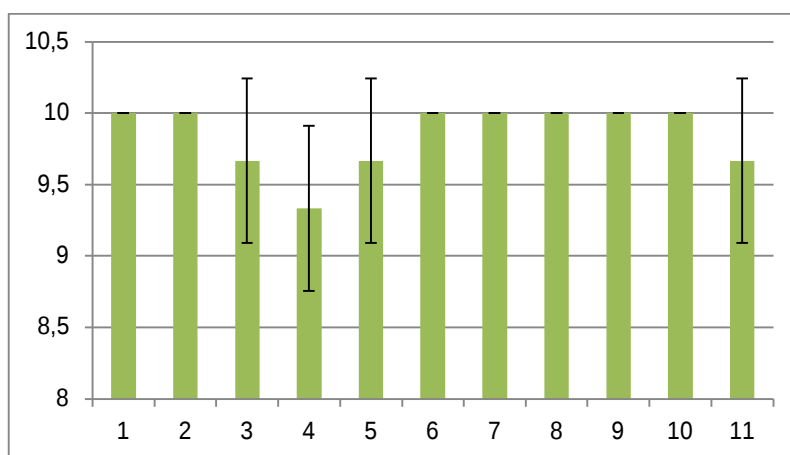
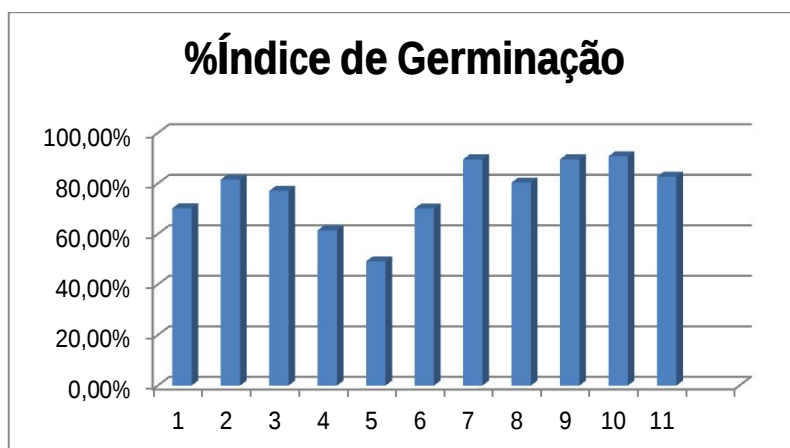


Gráfico 5. Desvio Padrão e Média do índice de germinação do teste de fitotoxicidade.

Gráfico 6. Índice de Germinação (IG%) das sementes de pepino caipira, em ensaios de otimização de *Aspergillus flavus* (AFL59), crescidas na concentração 5% de óleo diesel após cinco dias de crescimento da raiz.

5. CONCLUSÃO

A linhagem *Aspergillus aculeatus* foi a mais frequente seguida de *Aspergillus flavus*, no entanto, não apresentou bons índices de degradação de óleo diesel, e das linhagens de *A. flavus* somente uma apresentou resultados satisfatórios seguida de *A. tamarii*, ambos mostraram-se promissores no tratamento de ambiente marinho poluído por óleo diesel. *A. niger* apresentou os menores índices de degradação de óleo diesel. Diante dos resultados dos testes de otimização e de fitotoxicidade concluímos que o tratamento do petroderivado óleo diesel utilizando linhagens fúngicas é eficiente na degradação de hidrocarbonetos de cadeias longas não apresentando toxicidade para o meio ambiente. O gênero *Aspergillus* além de ser um fungo encontrado em águas marinhas apresenta potencial para ser utilizado em tratamento de regiões marinhas após contaminação por petroderivados.

6 REFERÊNCIA

- Abarca, M.L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis Nosocomial. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals (Microbiologia), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain. *Rev Iberoam Micol* **17**: 79-84.
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1739-1745.
- Akar, T. & Tunali, S. 2006. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology* **97**, 1780–1787.
- Aleshin, A., Golubev, A., Firsov, L.M., and Honzatko, R.B. 1992. Crystal Structure of Glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *X100* to 2.2-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. **267**, No. 27, pp. 19291-13'298.
- Anastasi, A., Prigione, V., Casieri, L., Varese, G.C. 2009. Decolourisation of model and industrial dyes by mitosporic fungi in different culture conditions. *World J Microbiol Biotechnol* **25**:1363–1374.
- Andleeb, S., Atiq, N., Robson, G.D., Ahmed, S. 2012. An investigation of anthraquinone dye biodegradation by immobilized *Aspergillus flavus* in fluidized bed bioreactor. *Environ Sci Pollut Res* **19**:1728–1737.
- Antia, B.S., Aree, T., Kasettrathat, C., Wiyakrutta, S., Ekpa, O.D., Ekpe, U.J., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P. 2011. Itaconic acid derivatives and diketopiperazine from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus* CRI322-03. *Phytochemistry* **72**, 816–820.
- Baddley J.W, Pappas P.G., Smith A.C., Moser S.A. 2003. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* **41**: 5525-5529.
- Baker, K.H. & Herson, D.S., Microbiology and Biodegradation, In: Baker, K.H.; Herson, D.S. (Ed). Bioremediation, McGraw Hill, Inc: USA, 1994, cap.2, p. 11-60.
- Baek, K.H., Kim, H.S., Oh, H.M., Yoon, B.D., Kim, J., Lee, I.S. 2004. Effects of Crude Oil, Oil Components, and Bioremediation on Plant Growth. *Journal of Environmental Science and Health. Part A—Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. Vol. **A39**, No. 9, pp. 2465–2472.
- Balajee, S.A. 2009. *Aspergillus terreus* complex. Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Coention Atlanta, Georgia, USA. *Medical Mycology*. **47** (Supplement 1), 42-46.
- Basheer, S.M., Chellappan, S., Beena, P.S., Sukumaran, R.K., Elyas. K.K. and Chandrasekaran, M. 2011. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032:

Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology* **28**, 6.

Botella, C., Orya, I., Webbb, C., Cantero, D., Blandino, A. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal* **26**, 100–106.

Brink, H.J.M.V.D., Gorcom, R.F.M.V., Hondel, C.A.M.J.J.V.D., Punt, P.J. 1998. Cytocromo P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Gen. Biol.*, 23: 1 – 17.

Conceição, D.M., Angelis, D.A., Bidoia, E.D., Angelis, D.F. de, 2005. Fungos Filamentosos Isolados do Rio Atibaia, SP e Refinaria de Petróleo Biodegradadores de Compostos Fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **72**, n.1:99-106.

Costa, A.M., Ribeiro, W.X., Kato, E., Monteiro, A.R.G., Peralta, R.M. 2008. Production of tannase by *Aspergillus tamaraii* in submerged cultures. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol.**51**, p.399-404.

Dhar, K., Dutta, S., Anwar, M.N. 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbon by two *Aspergillus* spp. and two *Penicillium* spp. isolated from the contaminated soil and water of ship breaking yard. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* **14**, Issue 1, Pages 143-148.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I., Samson, R.A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Samson RA, Pitt JI, eds. New York: Plenum Press: 55–62.

Garon, D., Krivobok, S., Seigle-Murandi, F. 2000. Fungal degradation of fluorene *Chemosphere* **40**, 91-97.

Gomes, D.N.F. Cavalcanti, M.A.Q., Fernandes, M.J.S., Lima, D.M.M. and Passavante, J.Z.O. 2008. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Biol.*, **68**(3): 577-582.

Gomes, E.B. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Antibióticos Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos. Biodegradabilidade de Querosene de Aviação Movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-Pe. Recife, 2004. Dissertação.

Gomes, E.C., Negrelle, R.R.B., Elpo, R.E.S. 2008. Determinação da qualidade microbiológica e físico-química de chás de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (capim-limao). *Acta Scientiarum Health Sciences* (UEM), Vol.**30**(1), p.47(8).

Graham, H.D. 1982. The Safety of foods. AVI Publishing Company, Connecticut.

Hanson, K.G., Desai, D., Desai, A, J., 1993. A rapid and simple screening technique for potencial crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* **7** (10): 745-748.

Hara, S., Kitamoto, K., Gomi, K. 1992. New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Biology and Industrial Applications* (Eds. J. W. Bennett & M. A. Klich), pp 133-153. Boston: Butterworth-Heinemann.

- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**:1677–92.
- International Agency of Research on Cancer - IARC. 1997. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. In: IARC Monographs. Lyon, p. 245-395.
- Jacques, R.J.S. 2005. Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um solo.
- Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O. 2007. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.**37**, n.4, p.1192-1201.
- Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Camargo, F.A.O. 2007. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência e Natura*, UFSM, **29** (1): 7 – 24.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F, Minter, D.W., Stalpes, J.A. 2008. *Dictionary of Fungi*. 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, 771 p.
- Klich MA. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. First Ed. 122 pp. Central albureauvoor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands.
- Kormelink, F.J.M., Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M., and Voragen, A.G.J. 1991. Purification and characterization of a (1,4)-/ -D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**:753-758.
- Kumari, M. & Abraham, J. 2011. Biodegradation of diesel oil using yeast *Rhodosporidium toruloides*. *Research Journal of Environmental Toxicology* **5(6)**: 369-377.
- Lekha, P.K., Chand, N., Lonsane, B.K. 1994. Computerized study of interactions among factors and their optimisation through response surface methodology for the production of tannin acyl hydrolase by *Aspergillus niger* PKL 104 under solid state fermentation. *Bioprocess Eng* **11**:7–15.
- Leoni, L.A.B., Furlani, R.F.Z., Valente Soares, L.M., Oliveira, P.L.C. 2001. Ocratoxina A em café verde brasileiro. *Cienc.Tecnol. Aliment.*, **21**, 105-107.
- Li, J., Xia, W., Tang, C., Wang, Z., Xiao, X., Zhong, H. 2010. Optimization of nutrition condition for biodegradation of diesel oil using response surface methodology. *The National Natural Science Foundation of China*. **978:1**, 4244-4713.
- Liu, P.W.G., Chang, T.C., Whang, L.M., Kao, C.H., Pan, P.T., Cheng, S.S. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**, 1119 e 1127.
- Maciel, C.C.S., Takaki, G.M.C., Gusmão, N.B. 2010. Potencialidade de Fungos Filamentosos em Degradar Óleos Lubrificantes. Filamentous fungi potential to degrade lubricant oils. *Revista Eletrônica de Biologia (REB)*. Volume **3** (1): 58-64.

- Magnuson, J., Lasure, L. 2004. Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz J, Lange L (eds). *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. New York: Kluwer Academic & Plenum Publishers, 307_340.
- Manafi, Z., Abdollahi, H., Majd, M.Z., Golbang, N., Emtiazi, G., Olson, G.J. 2012. Isolation and identification of microorganisms causing microbial degradation of organic phase of the solvent extraction unit in the copper industries. *International Journal of Mineral Processing* v.**112–113**, p.43–48.
- Marín, S., Velluti, A., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2004. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiol.* **21**, 313-318.
- Maruthi, Y.A., Hossain, K. and Thakre, S. 2013. *Aspergillus flavus*: A potential Bioremediator for oil contaminated soils. *European Journal of Sustainable Development.* **2**, 1, 57-66.
- Mazzuco, L.M. 2004. *Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo Diesel*. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Química Pós-graduação em Química Analítica. Florianópolis, Dissertação.
- Michailides T.J, Thomidis T. 2007. First report of *Aspergillus flavus* causing fruit rots of peaches in Greece. *Plant Pathol.* **56**:352.
- Passarini, M.V.N., Michel, R.Z., Rodrigues, M.S., Sette, L.D. 2011. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* **62**, 364–370.
- Miranda, R.C., Souza, C.S., Gomes, E.B., Lovaglio, R.B., Lopes, C.E., and 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. *Printed in Brazil* Vol.**50**, n. 1: pp.147-152.
- Moreira, F.G., Lima, F.A., Pedrinho, S.R.F., Lenartovicz, V., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. 1999. Produção de amilases por *Aspergillus tamaraii*. Production of amylases by *Aspergillus tamaraii*. *Revista de Microbiologia* Vol.**30**, p.157-162.
- Nunberg, J.H., Meade, C.G., Lawyer, F.C., McCabe, P., Schweickart, V., Tal, R., Wittman, V.P., Flatgaard, J.E, and Innis, M.A. 1984. Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol. Cell. Biol.* **4**(11):2306.
- Pacheco, A.M., Lucas, A., Parente, R., Pacheco, N. 2010. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **30**(2): 330-334.
- Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M.H., Hashimoto, J.M., Menezes, H.C. 2005. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology* Vol.**36**, p.24-28.
- Passos, C.T., Burkert, J.F.M., Kalil, S.J. e Burkert, C.A.V. 2009. Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil. Biodegradação de Fenol por uma Nova Linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um Solo Contaminado do Sul do Brasil. *Quim. Nova*, Vol. **32**, No. 4, 950-954.

- Pavezzi, F.C., Gomes, E., Silva, R. 2008. Production and Characterization of Glucoamylase from Fungus *Aspergillus awamori* expressed in Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Using Different Carbon Sources. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**:108-114.
- Pereira Jr., N., Gomes, E.B., Soriano, A.U. 2009. Biodegradação de Hidrocarbonetos. 1ª edição, Rio de Janeiro, *Séries em Biotecnologia volume 3*.
- Perfect, J.R., Cox, G.M., JY, L. 2001. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis.* **33**: 1824-1833.
- Pitt, J.I., Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2000. List of accepted species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*. Samson RA, Pitt JI, eds. Amsterdam: Harwood Academic Publishers: 9–47.
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmana perumalsamy, P., Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* **85**, 257–261.
- Ramalingam, N.S., Shanmgapriya, S., Shakthipriyadarshini, S., Sadasivam, S. and Shanmgaprakash, M. 2010. Descolorization of textile dyes by *Aspergillus tamari* mixed fungal culture and *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Scientific & Industrial Research* vol. **69**, pp. 151- 153.
- Raper, K.B. & Fennell, D.I. 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. pp 686.
- Rivera-Cruz, M.C. & Trujillo-Narcia, A. 2004. Estudio de toxicidade vegetal em suelo com petróleos nuevo e inteperizado. *Interciência* **29** (7): 369-376.
- Rosato, Y. B. 1997. Biodegradação do petróleo. apud Melo I. S & Azevedo, J. L. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*. 14:307-334.
- Sales, M.R., Moura, R.B., Porto, T.S., Macedo, G.R., Porto, A.L.F. 2010. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanase por espécies de *Aspergillus* Variables that influence the production of cellulases and xylanase by *Aspergillus* species. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Vol.**45**, p.1290-1296.
- Samson, R.A. (2000). List of names of *Trichocomaceae* published between 1992 and 1999. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*. Samson RA, Pitt JI, eds. Amsterdam: Harwood Academic Publishers: 73–79.
- Santos, R.C.B. 2010. Fungos isolados de macro-organismos marinhos brasileiros: diversidade genética e potencial biotecnológico. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP: Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Tese.
- Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F., Fungaro, M.H.P., Sartori, D., Alves, E. 2011. Identification of Fungi of the Genus *Aspergillus* Section Nigri Using Polyphasic. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**: 761-773.

- Silva, M., Esposito, E. 2010. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito, E., Azevedo, J.L. (eds). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caixias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 337 – 378.
- Souza, F.A.S.D. 2009. Biodegradação de óleo diesel por *cândida lyipolitica* em água do mar. Universidade católica de PE. Dissertação.
- Souza, F.A.S.D., Salgueiro, A.A., Albuquerque, C.D.C. 2012. Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **29**, 01, 61 – 67.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V., Daniel, D., Gerginova, M., Alexieva, Z. 2006. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 1036–1041.
- Sutherland, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Ind. Microbiol.*, 9: 53 – 62.
- Teixeira, M. F. S., Filho, J. L. L., Durán, N. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586 *Braz J Microbiol*, v.31, p. 286-290.
- Tiquia, S.M., Tam, N.F., Hodgkiss, I.J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environonmental Pollution* **93**(3):249-256.
- Ururahy, A.P. 1998. Performance of a CSTR type Bireactor in the Degradation Process of Oily Sludge. *Bol. Tec. Petrobras* **41** (3/4): 125-132.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. and Samson, R.A. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* **69**: 1–17.
- Varga, J., Toth, B., Kocsube, S. 2005. Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**: 141-150.
- Velasco-Alvarez, N., González, I., Damian-Matsumura, P., Gutiérrez-Rojas, M. 2011. Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresource Technology* **102**: 1509–1515.
- Veliev, M.G., Danielsson, B., Salmanov, M.A., Alieva, S.R., and Bektashi, N.R. 2008. Biodegradation of Baku Oil and Hydrocarbons by Micromycetes. ISSN 0965-5441, *Petroleum Chemistry* Vol. **48**, No. 1, pp. 56–62.
- Volke-Sepulveda, T., Gutierrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology* **97**,1583–1591.
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A.K., Telang, A.G. 2005. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 607-615.

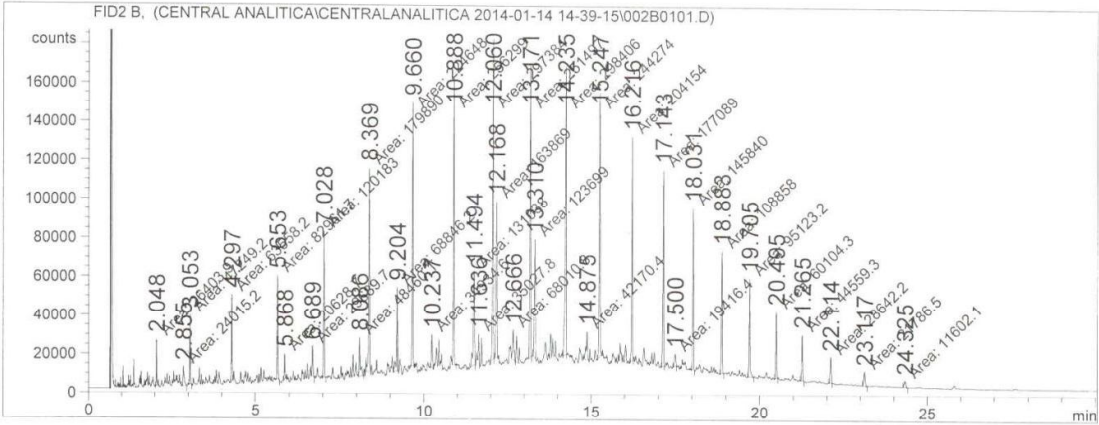
- Yi, T., Lee, E., Park, H., & Cho, K. 2011. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Neosartorya* sp. BL4, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **46**:14, 1763-1768.
- Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C., Bennett, J.W. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Rev. Iberoam. Mycol.* **22**:192–202.
- Zahra, S., Abbas, S.S., Mahsa, M.T., Mohsen, N. 2010. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management* **30**, 396–401.
- Antoniolli engenharia. Aneng Indústria e Comercio de produtos metálicos Ltda. <http://www.aneng.com.br/index.php?view=article&catid=12%3Aartigos&id=16%3...> ACESSO em: 18/03/2013.
- Agência Nacional de Petróleo. <http://www.anp.gov.br/?pg=58524>. Acesso: 28/11/2013 as 10:20hs. <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/articles/indextaxonomy.php~main>
- PETROBRÁS. Disponível em: <<http://www.br.com.br>> Acesso em: 16 de janeiro de 2013.
- ANENG Indústria e Comércio de Produtos Metálicos Ltda. Disponível em: <<http://www.aneng.com.br>> acesso em: 17/01/2013.
- Mycobank. <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=119955> Acesso em 23/01/2013.

APÊNDICES

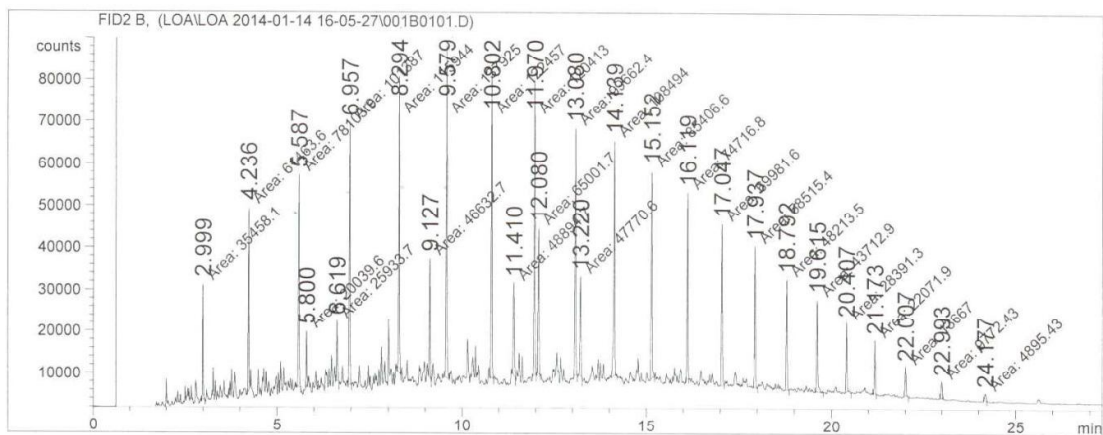
Resultados da análise no cromatógrafo gasoso (GC) dos ensaios de degradação do óleo diesel, por *Aspergillus flavus*, do experimento de otimização das condições nutricionais.

	Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	Ensaio 04	Ensaio 05	Ensaio 06	Ensaio 07	Ensaio 08	Ensaio 09	Ensaio 10	Ensaio 11
Nonano	100%	0	0	43,63%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Decano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Undecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dodecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tridecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetradecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentadecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hexadecano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heptadecano	9,21%	0	0	11,27%	20,85%	16,99%	15,73%	8,54%	7,44%	3,35%	7,96%
Octadecano	11,15%	0	0	15,62%	10,17%	13,53%	21,8%	8,55%	11,61%	9,77%	10,19%
Nonadecano	18,48%	0	0	19,81%	17,09%	24,08%	27,44%	20,37%	17,94%	15,79%	17,4%
Eicosano	21,61%	0	0	25,79%	16,69%	25,43%	27,76%	23,22%	19,13%	16,93%	22,57%
Heneicosano	17,94%	0	0	5,77%	32,55%	22,94%	26%	19,59%	18,98%	37,11%	19,43%

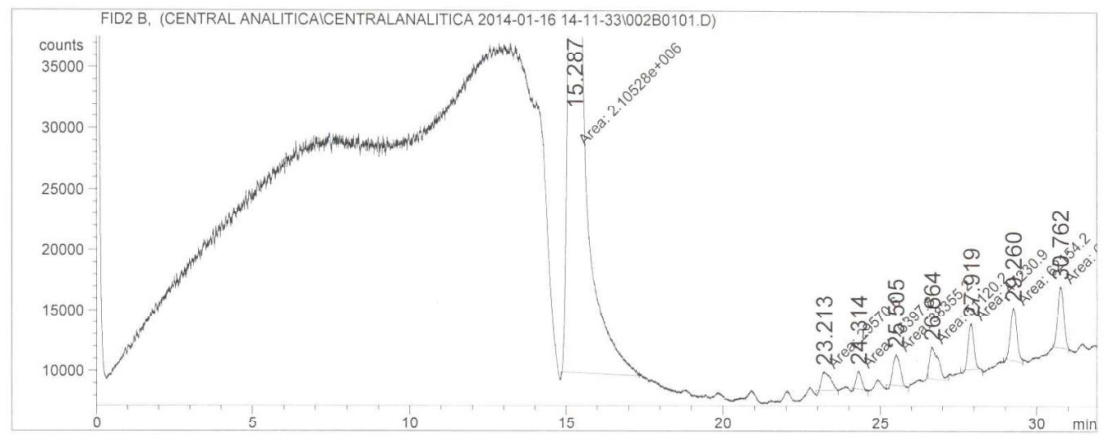
Padrão



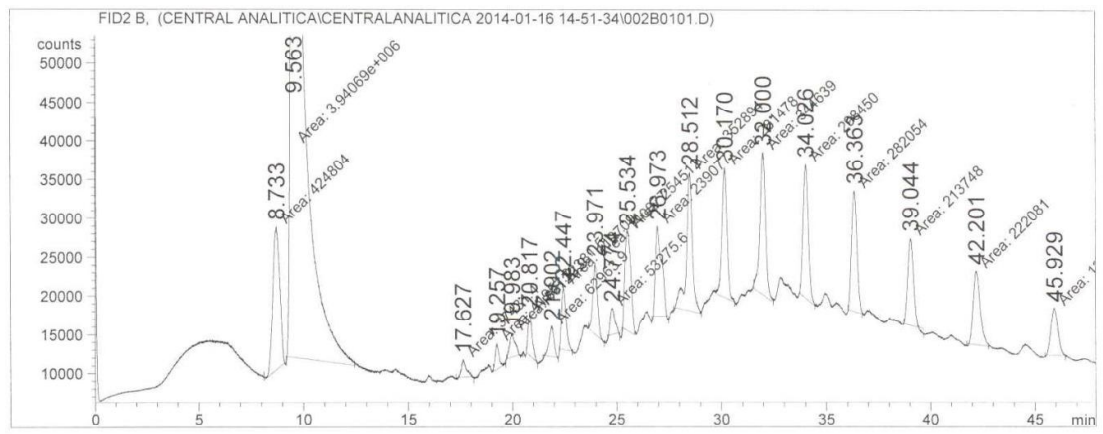
Ensaio 01

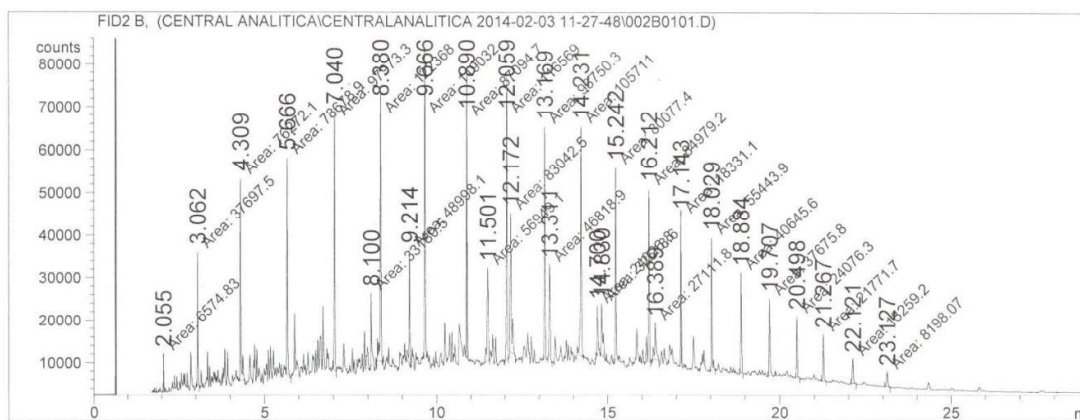
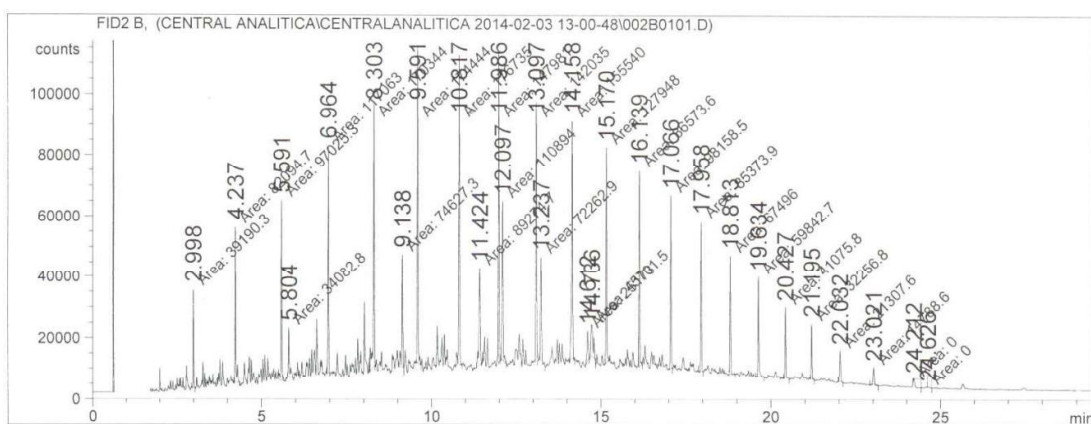
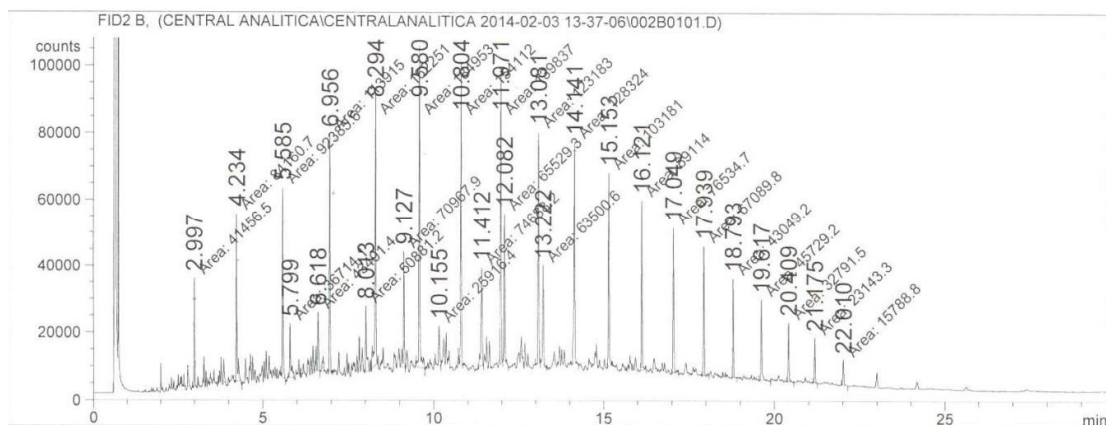


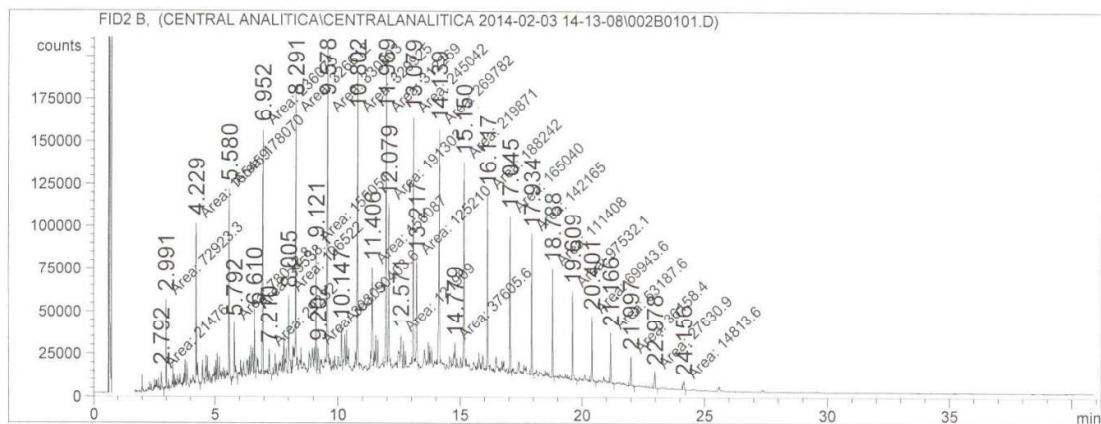
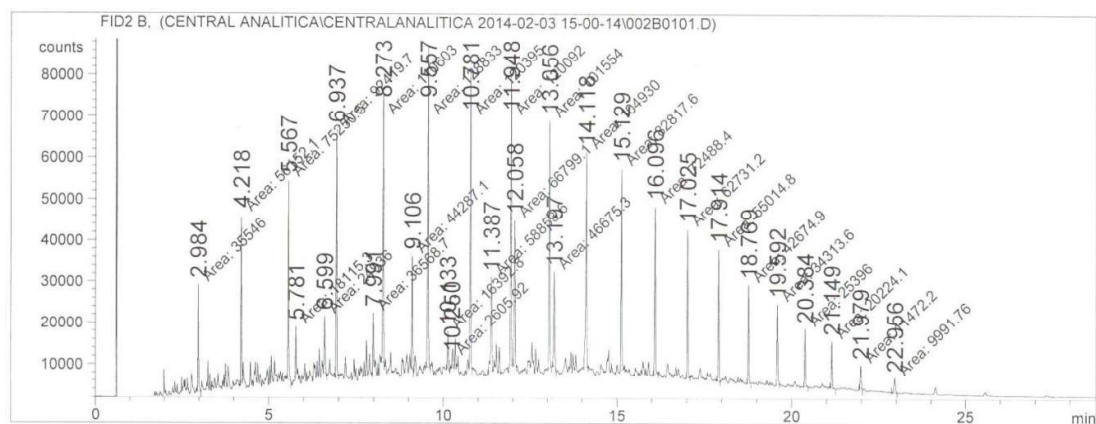
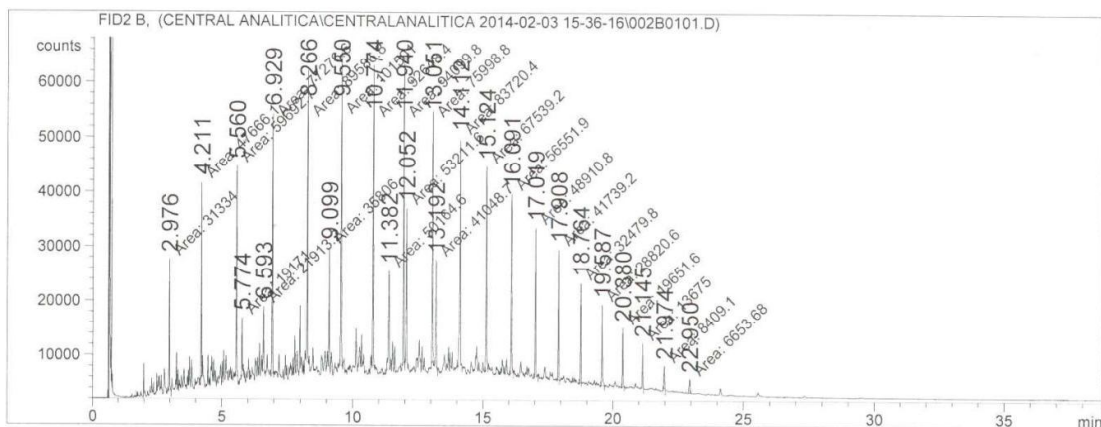
Ensaio 02



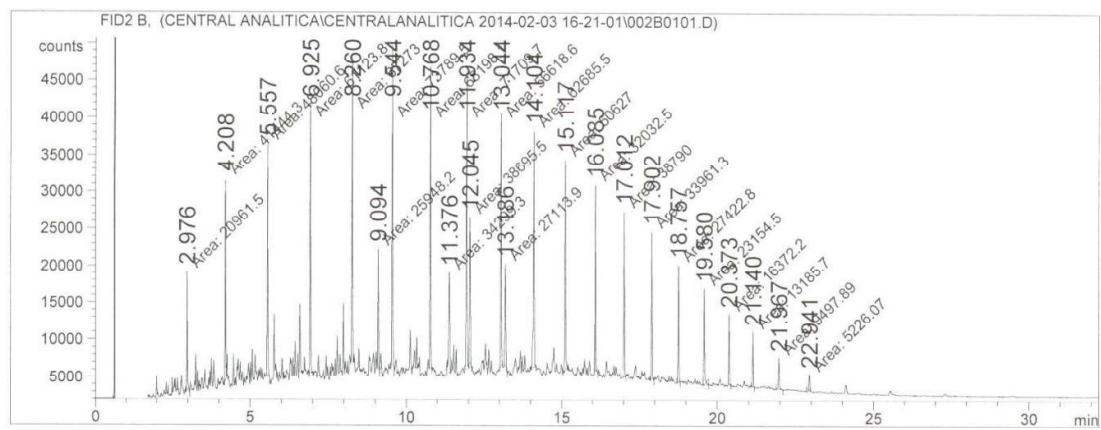
Ensaio 03



Ensaio 04**Ensaio 05****Ensaio 06**

Ensaio 07**Ensaio 08****Ensaio 09**

Ensaio 10



Ensaio 11

