



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR *Trichoderma*
spp. ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA**

NADIONARA COSTA MENEZES

**Manaus – AM
Agosto de 2022**

NADIONARA COSTA MENEZES

**DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR *Trichoderma*
spp. ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção de Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira

**Manaus – AM
Agosto de 2022**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

N136dd Menezes, Nadionara Costa
DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO
POR *Trichoderma* spp. ISOLADOS DE SOLOS DA
AMAZÔNIA / Nadionara Costa Menezes. Manaus : [s.n],
2022.
79 f.: color.; 2 cm.

Tese - Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia
da Amazônia - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2022.
Inclui bibliografia
Orientador: Luiz Antonio de Oliveira

1. Biodegradação. 2. *Trichodermas*. 3. Petróleo. 4.
Amazônia. I. Luiz Antonio de Oliveira (Orient.). II.
Universidade do Estado do Amazonas. III.
DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR
Trichoderma spp. ISOLADOS DE SOLOS DA
AMAZÔNIA

NADIONARA COSTA MENEZES

DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DE PETRÓLEO POR TRICHODERMA SPP. ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador (a): **Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira**

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA
Data: 01/09/2022 11:17:44-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira
Presidente (INPA)

Documento assinado digitalmente
 AFONSO DUARTE LEAO DE SOUZA
Data: 04/04/2023 16:28:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Membro Titular Interno (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA
Data: 10/04/2023 11:50:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Membro Titular Interno (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 ALOISIO FREITAS CHAGAS JUNIOR
Data: 19/09/2022 08:10:28-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Júnior
Membro Titular Externo (UFT)

Documento assinado digitalmente
 JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA
Data: 03/04/2023 15:41:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Suplente (INPA)

MANAUS-AMAZONAS
agosto/2022

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Estado do Amazonas, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, pela oportunidade de qualificação profissional;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, pela atenção e ensinamentos preciosos e, aos meus colegas de turma de 2017;

Aos membros da banca da Aula de Qualificação pelas sugestões e contribuições;

Ao meu orientador Dr. Luiz Antonio de Oliveira, apoio, ensinamentos, dedicação, compreensão e pela oportunidade de enriquecer meus conhecimentos e ao longo do desenvolvimento de todo o meu trabalho;

Ao mestre Francisco Wesen, pela prontidão em me ajudar sempre que preciso;

Às amigas (os) e irmãos (ãos) de orientação do LEBMAM, que sempre estiveram dispostos a discutir dúvidas, mesmo que ficássemos mais em dúvidas, pontos de vista, além de auxiliar nos momentos mais difíceis, pela amizade incondicional;

Aos meus pais, que mesmo longe sempre em momentos incertos, de angústia e dificuldades me mostraram que obstáculos são feitos para serem superados e que em cada um deles aprendemos a ter mais confiança em nós mesmos, a ter fé e esperar em Deus; a ser humilde para encarar os erros e humilde também para lidar com vitórias;

Ao meu irmão, que sempre se fez presente acreditando e compartilhando sempre com entusiasmo cada novo passo que eu dava, me impulsionando sempre a ir além, a sempre buscar por novos conhecimentos;

Aos meus familiares;

À Deus, por guiar e iluminar meu caminho.

Muito obrigada!

“ Eu tentei 99 vezes e falhei,
mas na centésima tentativa eu consegui,
nunca desista de seus objetivos mesmo que pareçam
impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa. ”

Albert Einstein

RESUMO

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de substâncias inorgânicas e orgânicas, variável com as condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. Devido ao grande impacto ambiental causado por acidentes envolvendo atividades petrolíferas e pela dificuldade no seu tratamento, processos de biorremediação vêm sendo amplamente estudados e com isso, são cada vez mais utilizados microrganismos capazes de degradar óleo. Os fungos do gênero *Trichoderma* fazem parte da população microbiana do solo, raramente são patogênicos a animais e plantas e estudos realizados demonstram sua habilidade em processos de remediação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo selecionar fungos *Trichoderma* spp. obtidos de solos da Amazônia, avaliando suas capacidades de degradação e mineralização de hidrocarbonetos do petróleo. Para tanto, foram isolados 96 fungos de solos coletados no entorno da cidade de Manaus, dos quais 43 foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Estes foram avaliados em meio sólido quanto ao seu crescimento micelial, utilizando-se derivados de petróleo (nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante) como fontes de carbono. Posteriormente, os fungos foram testados em meio líquido INPA contendo derivados de petróleo como fonte de carbono e utilizando-se o indicador Diclorofenol Indofenol – DCPIP e então avaliados quanto a produção de biossurfactantes por meio da avaliação da atividade de emulsificação em petróleo. Os resultados mostram que os 43 fungos foram capazes de crescerem na presença dos hidrocarbonetos, apresentando médias elevadas até 96h. Através do teste com o indicador Diclorofenol Indofenol foram selecionados 10 fungos (INPA F8, F23, F25, F29, F31, F33, F35, F38, F36 e F41) que apresentaram altas porcentagens de descoloração (30% a 40%) e estabilidade na atividade degradativa, com até cinco dias de incubação nos derivados testados. Os resultados demonstraram ainda que todos os 10 *Trichoderma* apresentaram atividade emulsificante em A/O variando de 5,45 UE no meio mineral INPA e 2,91 UE em BH, às 48h de incubação. Os índices de emulsificação obtiveram valores satisfatórios com 28,37% e 18,38%, no meio INPA e BH, respectivamente. Deste modo, os testes realizados sugerem que os *Trichoderma* spp. podem ser utilizados para a biorremediação de hidrocarbonetos derivados de petróleo, sendo necessários mais estudos, a fim de obter microrganismos capazes de atuar na biorremediação de ambientes contaminados.

Palavras-chave – biodegradação, *trichoderma*, petróleo, Amazônia.

ABSTRACT

Petroleum is constituted by a complex mixture of inorganic and organic substances, variable with the physical-chemical, biological and geological conditions of the environment in which it was formed. Due to the great environmental impact caused by accidents involving oil activities and the difficulty in their treatment, bioremediation processes have been widely studied and with that, microorganisms capable of degrading oil are increasingly being used. Fungi of the genus *Trichoderma* are part of the microbial population of the soil, they are rarely pathogenic to animals and plants and studies have demonstrated their ability in remediation processes. Thus, this work aimed to select fungi *Trichoderma* spp. obtained from soils in the Amazon, evaluating their capacities for degradation and mineralization of petroleum hydrocarbons. For this purpose, 96 fungi were isolated from soils collected around the city of Manaus, of which 43 were identified as belonging to the genus *Trichoderma*. These were evaluated in solid medium for their mycelial growth, using petroleum derivatives (naphtha, gasoline, kerosene, diesel oil and lubricating oil) as carbon sources. Subsequently, the fungi were tested in INPA liquid medium containing petroleum derivatives as a carbon source and using the indicator Dichlorophenol Indophenol - DCPIP and then evaluated for the production of biosurfactants by evaluating the emulsification activity in petroleum. The results show that the 43 fungi were able to grow in the presence of hydrocarbons, showing high averages up to 96h. Through the test with the Dichlorophenol Indophenol indicator, 10 fungi were selected (INPA F8, F23, F25, F29, F31, F33, F35, F38, F36 and F41) that presented high percentages of discoloration (30% to 40%) and stability in the degradative activity, with up to five days of incubation in the derivatives tested. The results also showed that all 10 *Trichoderma* presented emulsifying activity in W/O ranging from 5.45 EU in INPA mineral medium and 2.91 EU in BH, at 48 hours of incubation. The emulsification indices obtained satisfactory values with 28.37% and 18.38%, in INPA and BH medium, respectively. Thus, the tests carried out suggest that *Trichoderma* spp. can be used for the bioremediation of oil-derived hydrocarbons, and further studies are needed in order to obtain microorganisms capable of acting in the bioremediation of contaminated environments.

Keywords – biodegradation, *trichodermas*, petroleum, Amazon.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos adquiridos através do isolamento de solos e seus respectivos locais de coleta.	32
Tabela 2. Crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. em meio BDA (controle) e meio INPA com os diferentes derivados de petróleo.....	37
Tabela 3. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de nafta, em relação ao controle sem inóculo.....	41
Tabela 4. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de gasolina, em relação ao controle sem inóculo.....	42
Tabela 5. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de querosene, em relação ao controle sem inóculo.....	43
Tabela 6. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de óleo diesel, em relação ao controle sem inóculo.....	44
Tabela 7. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de óleo lubrificante, em relação ao controle sem inóculo.	45
Tabela 8. Atividade emulsificante água em óleo (CE), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.	48
Tabela 9. Atividade emulsificante óleo em água (densidade óptica), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.....	50
Tabela 10. Avaliação de pH nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.....	51
Tabela 11. Volume degradado do petróleo (redução), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas metabólicas de biodegradação aeróbia de <i>n</i> -alcanos.....	18
Figura 2. Representação de uma molécula de biossurfactante, interações hidrofílicas-hidrofóbicas.	19
Figura 3. Fluxograma do procedimento seguido para isolamento dos fungos.	24
Figura 4. Equação da reta formada para obtenção da concentração de DCPIP (oxirredução) em cada isolado.	26
Figura 5. Representação esquemática do teste de atividade emulsificante.	28
Figura 6. Percentual de ocorrência de gêneros fúngicos isolados de 16 amostras de solos coletadas no entorno da cidade de Manaus-AM.....	30
Figura 7. Colônias de <i>Trichoderma</i> spp. com 5 dias de crescimento em meio BDA, a 28 ± 2 °C. (A) INPA F01, (B) INPA F03, (C) INPA F14, (D) INPA F29 e (E) INPA F40.....	31
Figura 8. Diferenças observadas no crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. (isolado INPA F41) em diferentes fontes de carbono, após 96h de incubação, em comparação ao controle. .	36
Figura 9. Demonstração da avaliação do potencial de degradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A: controle sem descoloração do indicador; B: isolado INPA F14 após 72 horas de incubação, em gasolina.	40
Figura 10. Atividade emulsificante nos meios minerais INPA (A) e BH (B) em dois dias de incubação.	49
Figura 11. Índice de Emulsificação (IE) das cepas de <i>Trichoderma</i> spp. na presença de petróleo em meios minerais INPA e BH, às 24 e 48h.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 PETRÓLEO, SEUS DERIVADOS E IMPACTOS CAUSADOS PELA SUA DEPOSIÇÃO.....	14
2.2 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO: BIORREMEDIAÇÃO	16
2.3 <i>Trichoderma</i> spp.....	20
3 MATERIAL E METÓDOS	23
3.1 COLETA DOS SOLOS.....	23
3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	24
3.4 CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO	25
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP	25
3.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	27
3.6.1 Determinação da atividade emulsificante.....	27
3.7 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	30
4.2 CRESCIMENTO MICEIAL EM MEIO SÓLIDO	33
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP	40
4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	47
4.6 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	52
5 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
Apêndices	63
Anexos	75

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de substâncias inorgânicas e orgânicas, variável com as condições físico-químicas, biológicas e geológicas do ambiente em que ele foi formado. A presença desses compostos no solo e sedimentos, causam um grande efeito sobre as propriedades do ambiente contaminado. Observam-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (WEBER e SANTOS, 2013).

Normalmente as contaminações de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes. Isso demonstra a importância de recorrer a técnicas ou estudos que ofereçam subsídios para a montagem de operações de remediação dos danos causados, com menor custo e menor dano ambiental (DE SOUZA *et al.*, 2010).

A biorremediação é um processo que utiliza microrganismos para minimizar ou remover poluentes, inclusive hidrocarbonetos de petróleo do ambiente sem afetar o equilíbrio ecológico (DESAI e BANAT, 1997; AUTRY e ELLIS, 1992). A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença de uma população de microrganismos capazes de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação, transformando-as em estruturas inofensivas ou menos tóxicas (CHEN e UETA *et al.*, 1999).

Em trabalhos realizados foi constatado que os diferentes compostos de hidrocarbonetos nem sempre são degradados em igual proporção pelo mesmo microrganismo, defendendo assim, a ideia de que cada espécie é responsável por degradar um tipo de componente do óleo fazendo-se necessário o uso de consórcios para melhorar a eficiência da biorremediação (MENEZES *et al.*, 2019; CAUPER, 2018; ARUN e EYINI, 2011).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sintetizarem diversos metabólitos secundários, como por exemplo inibidores de fitopatógenos antimicrobianos, produtores de fitohormônios e diferentes enzimas (CHANDRA *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2000). Eles vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, podendo ser encontrados na rizosfera de plantas, em qualquer tipo de solo em que há matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio e em materiais vegetais em decomposição (CARRERAS-VILLASENÖR *et al.*, 2012). O sucesso na colonização de diversos *habitats* deve-se à sua potente maquinaria de degradação do substrato, que é realizada através de suas enzimas extracelulares (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010), tornando-os de grande interesse econômico.

A utilização dos fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* pode tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que sintetizam enzimas com elevado potencial e raramente são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem (KREDICS *et al.*, 2003; GROLL e WALSH, 2001).

1.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar fungos do gênero *Trichoderma* spp. obtidos de solos da Amazônia, avaliando suas capacidades de degradação e mineralização de hidrocarbonetos do petróleo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e selecionar linhagens fúngicas de *Trichoderma* spp. com a capacidade de degradação de nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante;
- b) Obter isolados de *Trichoderma* que apresentarem capacidade de utilizar hidrocarbonetos derivados de petróleo como fonte de carbono, através de enriquecimentos sob condições aeróbias;
- c) Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes pelos *Trichoderma* spp. obtidos, tendo o petróleo como única fonte de carbono.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PETRÓLEO, SEUS DERIVADOS E IMPACTOS CAUSADOS PELA SUA DEPOSIÇÃO

O petróleo é um produto natural formado pela ação de microrganismos sob condições de alta temperatura e pressão, e assim como os resíduos oleosos, é composto basicamente de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, água e sólidos, em proporções que variam conforme suas origens, possuindo pequenas quantidades de metais pesados (VAN HAMME *et al.*, 2003; CRAPEZ *et al.*, 2002).

Cerca de 60 a 90% dos componentes do petróleo são biodegradáveis, no entanto, de 10 a 40%, em estado bruto ou refinado, são recalcitrantes à degradação microbiana e persistem nos ecossistemas devido à sua natureza hidrofóbica e baixa volatilidade, representando assim uma ameaça significativa para o meio ambiente (SAWADOGO *et al.*, 2015). DE SOUZA *et al.* (2010) ressaltam que mesmo em pequenas concentrações, os casos de contaminação do solo e água por petróleo e seus derivados, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente.

O petróleo e seus subprodutos representam a principal fonte energética mundial, sendo responsável pela geração de 40% de toda a energia mundial. No entanto, é uma fonte geradora de resíduos oleosos de diversos tipos, em praticamente todas as suas operações, desde a perfuração, produção, armazenamento, transporte, refino, até a distribuição e consumo dos derivados. Por ser um produto de grande importância mundial, gerou uma extensiva exploração petrolífera associada à atividade antrópica, levando ao acúmulo de hidrocarbonetos a níveis indesejáveis no ambiente. Isso devido aos graves acidentes envolvendo navios petroleiros, rupturas de oleodutos, operações negligentes de carga e descarga nos terminais, lavagem de tanques de petróleo com água do mar, entre outros (SANTOS *et al.*, 2011).

Os processos de separação do petróleo produzem várias frações com aplicações comerciais definidas. Essas frações são distinguidas pelo número de átomos de carbono e do ponto de ebulição. De acordo com ANP (2022), nove principais subprodutos são extraídos por fração destilada da composição do petróleo bruto: Gás de petróleo: composto por um a dois átomos de carbono, usado para aquecimento e para indústria; Gás liquefeito de petróleo (GLP): com três a quatro átomos de carbono, usado principalmente para cozinhar; Nafta: constituída por cinco a dez átomos de carbono, produto intermediário que será transformado em gasolina ou servirá de matéria-prima em indústria petroquímica; Gasolina: formada por cinco a doze átomos de carbono, usada como combustível para motores de ciclo Otto (motores de pistão de ignição com faísca); Querosene: composto por hidrocarbonetos com 11 a 12 átomos de carbono,

serve como combustível para turbinas de jatos e outras aplicações. Óleo Diesel: formado por hidrocarbonetos com 13 a 18 átomos de carbono, utilizado como combustível em transporte rodoviário e aquaviário, em motores de ciclo diesel e, também utilizado em termelétricas e para aquecimento; Oleós Lubrificantes: composto por hidrocarbonetos com 26 a 38 átomos de carbono, utilizado principalmente na lubrificação de motores e engrenagens e como matéria-prima para graxas; Oléo Combustível: com até 39 átomos de carbono, usado como fonte de calor no segmento industrial. E Resíduos (coque, asfalto, alcatrão, breu, ceras e outros): até 80 átomos de carbono, que servem como material inicial para fabricação de outros produtos.

Os hidrocarbonetos compreendem classes de compostos orgânicos como alcanos, alcenos, alcinos, cicloalcanos (naftênicos) e aromáticos. Dentre as substâncias encontradas na composição do petróleo estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são contaminantes ambientais ubíquos de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica (SEO *et al.*, 2009).

Os HPAs abrangem uma variedade de hidrocarbonetos compostos de dois a sete anéis benzênicos, ocorrendo em mais de 100 substâncias nas quais possuem diferentes características físicas e químicas. Formam-se quando o material que contém carbono é queimado de maneira incompleta. São moléculas resistentes à oxidação, evaporação e redução, características essas que aumentam com o peso molecular. São classificados como de baixa à média solubilidade e de baixa à média volatilidade e, devido a essas características sua distribuição no meio ambiente é diferenciada (SILVA, 2018).

Os hidrocarbonetos aromáticos mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel, que exigem maior preocupação ambiental e que usualmente são os principais a serem identificados e quantificados no processo de remediação são os chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (International Agency for Research on Câncer - IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde, o benzeno se classifica no Grupo I, ou seja, é uma substância cancerígena, que também pode causar leucemia em seres humanos (MEHRALIPOUR; SAMARGHANDI E RAZZAGH, 2018).

Segundo DE SOUZA *et al.* (2016), esses compostos podem ser carregados para lugares distantes do ponto de origem. Assim, as áreas contaminadas podem afetar a qualidade dos recursos hídricos, diminuir o uso do solo, gerar danos à saúde e outras perdas ao meio ambiente (CETESB, 2022). Isso torna necessário o desenvolvimento de tratamentos de descontaminação de solo contaminado por poluentes orgânicos, destacando-se aqueles com mínimos impactos ambientais decorrentes do seu uso (CANET *et al.*, 2001).

Essa toxicidade de hidrocarbonetos de petróleo pode ser diminuída pela degradação por microrganismos. Assim, na tentativa de fazer reparo apropriado em áreas contaminadas, utiliza-se a técnica de biorremediação por microrganismos, com o objetivo de realizar a transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-lo ecologicamente inofensivo (JACQUES *et al.*, 2010).

2.2 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO: BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma tecnologia que minimiza ou remove poluentes, assim como os hidrocarbonetos de petróleo dos ambientes sem afetar o equilíbrio ecológico, acelerando através da biotecnologia a transformação destes poluentes em produtos menos tóxicos (TONINI *et al.*, 2010; DESAI e BANAT, 1997). Consiste em um processo onde microrganismos possuem a capacidade de degradar poluentes, transformando estes contaminantes em biomassa e subprodutos (SPINELLI *et al.*, 2007).

A biorremediação utiliza microrganismos autóctones ou alóctones, podendo ser realizada por bioaugmentação, bioestimulação ou atenuação natural monitorada (ANDRADE *et al.*, 2010). O emprego de microrganismos na remediação de ambientes impactados requer mecanismos para estimular e desenvolver a atividade microbiana na degradação de compostos de petróleo.

Estudos de biodegradação e toxicidade permitem a elaboração de um diagnóstico quanto à viabilidade da utilização dessa prática como técnica de remediação em caso de eventual derramamento de óleo (EMBRAPA, 2009).

De acordo com LEMOS *et al.* (2008), a diferença chave da biodegradação de petróleo em ecossistemas aquáticos e terrestres, após um derramamento de petróleo, relaciona-se com a movimentação e distribuição de óleo, bem como com a presença de partículas no seio da suspensão. Cada uma afeta a natureza química e física do óleo e, conseqüentemente, a sua susceptibilidade à degradação microbiana. O derramamento de óleo no solo caracteriza-se por movimentos verticais, e não pela propagação horizontal da mancha de petróleo que ocorre na água.

Sendo, nos processos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos realizados por bactérias e fungos, são necessárias condições adequadas para as reações de oxidação. Para VAN HAMME *et al.* (2003), a degradação do petróleo está acoplada a natureza química e estado físico dos compostos presentes, além das condições ambientais como pH, temperatura, nutrientes, salinidade e pressão. PETERS *et al.* (2005) e BERTHECORTI; FERZNER (2002) indicam que microrganismos aeróbios carecem de oxigênio

molecular para seu crescimento e para conversão de hidrocarbonetos em CO₂, H₂O e biomassa. Por outro lado, os microrganismos facultativos podem crescer na presença (aerobiose) ou ausência (anaeróbios, fermentação) de oxigênio.

As biotransformações oxidativas de hidrocarbonetos envolvem normalmente as enzimas chamadas oxigenases, as quais catalisam a inserção de um (monooxigenases) ou dois átomos de oxigênio (dioxigenases) em um ponto específico da molécula (SILVA DO ESPIRITO SANTO, 2002). Assim, o processo de oxidação dos *n*-alcanos ocorre com a biodegradação terminal formando álcool primário, aldeído e ácido carboxílico, que é utilizado como substrato para acil-CoA sintetase e então biodegradado pelo processo de β -oxidação. Além disso, ocorre também a biodegradação subterminal, que forma um álcool secundário, cetona, éster e ácidos carboxílicos que são biodegradados pelo processo de β -oxidação (Figura 1).

A biodegradação de hidrocarbonetos de cadeias menores (alifáticos) é substancialmente maior na fase inicial do processo de degradação quando comparados com os grupos aromáticos e polares, o que indica que a degradação desses compostos acontece mais rapidamente (LIU *et al.*, 2011).

A habilidade de utilização dos hidrocarbonetos saturados derivados do petróleo por microrganismos aeróbios e anaeróbios é descrita por vários autores (CAUPER *et al.*, 2021; SAVAGE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2006), cujos trabalhos sinalizam como fatores primordiais para ocorrer biodegradação a presença de aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos microrganismos de diferentes espécies.

Além disso, diversos estudos têm encontrado microrganismos degradadores em diferentes habitats contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (CRUZ e MARSAIOLI, 2012; SPINELLI, 2007; MENEGHETTI, 2007; SOUZA *et al.*, 2005; SANTOS, 2003). Demonstrando que diferentes gêneros de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e até mesmo algas unicelulares podem metabolizar hidrocarbonetos.

Essa disposição em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono já foi observada em estudos com uma grande variedade de gêneros de bactérias: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Nocardia* e fungos: *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Aspergillus*, *Syncephalastrum*, *Geotrichum* (JACQUES *et al.*, 2005a; 2007; MANDRI e LIN, 2007; MUTNURI *et al.*, 2005; MORGAN e WATKINSON, 1984). E vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, etc., vêm sendo amplamente isolados e estudados desde a década de 1950 (JACQUES *et al.*, 2005b; CERNIGLIA, 1997). Sendo as bactérias os microrganismos mais estudados, dentre as quais as *Pseudomonas* foram as primeiras a serem evidenciadas.

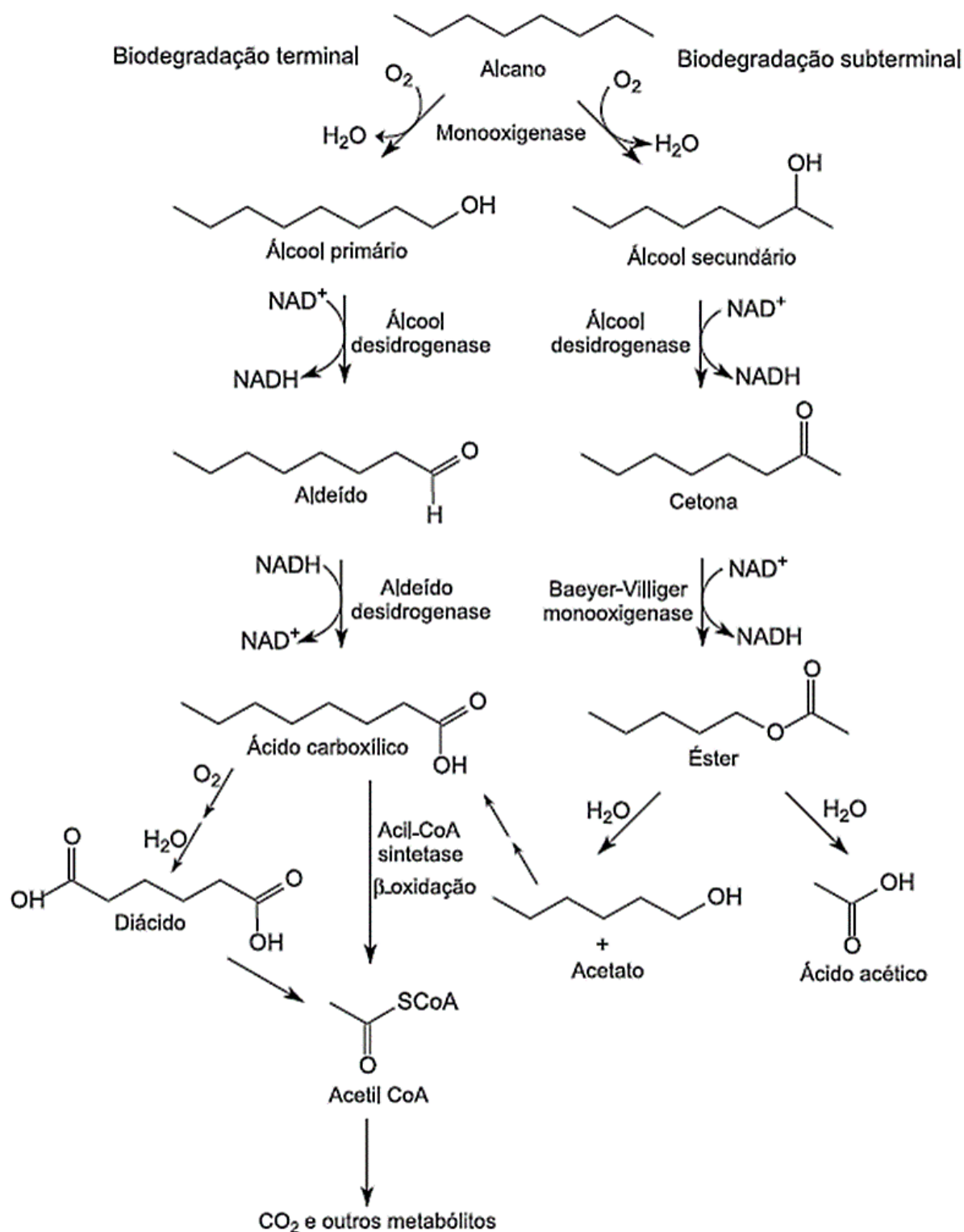


Figura 1. Rotas metabólicas de biodegradação aeróbia de *n*-alcanos.
 Fonte: CRUZ e MARSAIOLI (2012).

Embora exista uma diversidade de microrganismos com potencial de degradar hidrocarbonetos, a biodegradação de um contaminante complexo irá necessitar consórcios microbianos (culturas mistas) que são capazes de catalisar uma variedade de reações. As

interações ocorrem em cometabolismo, onde o subproduto de cada etapa é fonte de carbono para a outra, contribuindo assim, no aumento de atividades enzimáticas distintas, necessárias para a metabolização completa do poluente (LEMOS *et al.*, 2008; CRAPEZ *et al.*, 2002).

O aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio também pode ser influenciado pela produção de biossurfactantes. Estes são compostos de origem microbiana que apresentam propriedades surfactantes, atuando na diminuição da tensão superficial e possuindo alta capacidade emulsificante, podendo realizar misturas de hidrocarbonetos em água (NITSCHKE e PASTORE, 2002). O tipo de biossurfactante produzido pelo microrganismo é muito específico, podendo variar de espécie para espécie. As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, os quais são derivados de metabolismo de bactérias, fungos e leveduras (DE LIMA *et al.*, 2010).

A dinâmica do processo de biodegradação com a produção de biossurfactantes é baseada na habilidade de reduzirem a tensão superficial pelo rearranjo molecular, através do acúmulo de compostos insolúveis em superfícies, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas-hidrofóbicas (Figura 2). A área superficial aumenta, proporcionando uma maior biodisponibilidade e consequentemente o aumento da biodegradabilidade (CASTIGLIONI *et al.*, 2009).

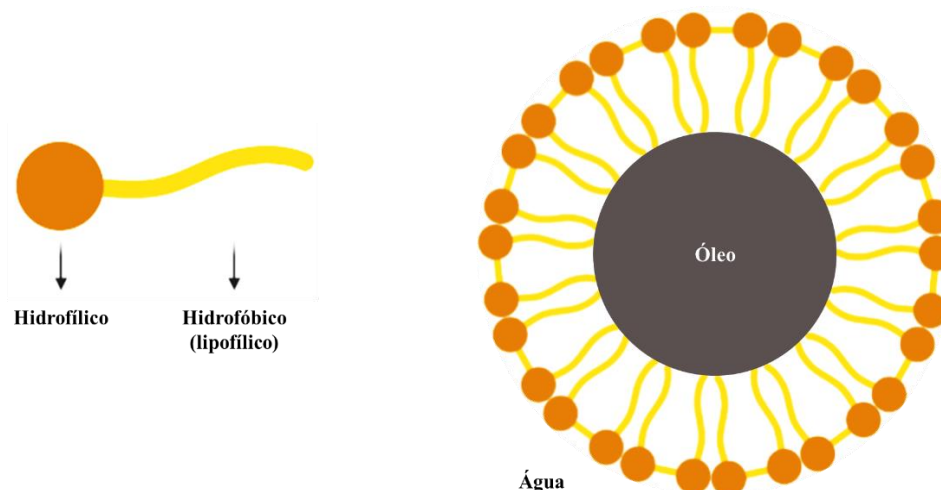


Figura 2. Representação de uma molécula de biossurfactante, interações hidrofílicas-hidrofóbicas.
Fonte: Autoria própria.

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos através de processos de fermentação, utilizando-se procedimentos simples e substratos baratos, são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos existentes e apresentam propriedades que estes não possuem, tais como a maior seletividade e atividade específica sob condições extremas de pH,

temperatura e salinidade. No entanto, devido ao seu alto custo de produção quando comparado aos sintéticos sua entrada no mercado em larga escala ainda está limitada (ROCHA, 2017).

Na Amazônia ainda há poucos estudos sobre o impacto negativo da contaminação com hidrocarbonetos de petróleo na microbiota dos solos regionais, bem como as características da população microbiana tolerante e possivelmente responsável pelo processo de biorremediação natural. Identificar essa população microbiana é o primeiro passo para desenvolver técnicas de descontaminação dos solos regionais e ecossistemas terrestres da Amazônia, caso ocorra derramamentos de petróleo ou seus derivados. A microbiota do solo é bem diversificada e bastante desconhecida (TORSVIK *et al.*, 2002), porém é possível estimar que existam linhagens muito úteis caso haja derramamentos de petróleo nos solos regionais.

2.3 *Trichoderma* spp.

Os *Trichoderma* spp. são fungos de vida livre, encontrados principalmente em solo, rizosfera de plantas ou material vegetal em decomposição. Pertencem ao filo Ascomycota, ordem Hypocrales, família Hypocreaceae (HARMAN *et al.*, 2004).

O gênero *Trichoderma* foi descrito pela primeira vez em 1794 por Persoon e Gray, possuindo quatro espécies. Em 1969, Rifai fez a primeira revisão taxonômica do gênero. No ano de 2020, em levantamento realizado por CAI e DRUZHININA (2021) e disponível no site da Subcomissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* (<https://trichoderma.info/2020/07/07/list-of-species-published/>), foram inventariadas 460 espécies pertencentes ao gênero, identificadas a partir de filogenia molecular.

Embora, inúmeras espécies venham sendo agregadas ao gênero *Trichoderma*, sua taxonomia torna-se bastante complexa por possuir pleomorfismo sexual (CORABIL-ADELL, 2004), variando sua forma de acordo com seu ciclo sexual ou condições ambientais.

A fase sexual (telemórfica) é classificada como ascomiceto de ordem Hypocrales, conhecida como *Hypocrea*. Nesta fase, muitas espécies produzem características da fase anamórfica *Trichoderma*, enquanto outras, apresentam dicotomização de conidióforos irregulares, característicos de outros gêneros. A fase assexual (anamórfica ou mitospórica) chamada de *Trichoderma*, é independente da fase telemórfica e tende a produzir dois ou mais tipos de esporos (HARMAN *et al.*, 2004; BISSET, 1991).

As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* possuem micélio que apresentam hifas hialinas com muitas ramificações e com parede lisa. As colônias crescem rapidamente em meio de cultura, apresentando como características macroscópicas, colônias de superfície lisa e translúcida, nos primeiros estágios de crescimento, seguida por uma aparência flocosa ou compacta. Os esporos geralmente apresentam coloração verde, mas podem variar de incolor á

cinza, dependendo da pigmentação e quantidade de conídios, além da influência do pH do meio (MARTINS, 2010; SAITO, 2009; ETHUR, 2006).

Devido à alta capacidade adaptativa, esses fungos podem ser encontrados parasitando outros fungos. Entretanto, colonizam principalmente solos ácidos, embora possam habitar em solos levemente básicos, utilizando diversas fontes de carbono e nitrogênio, além de secretarem diversas enzimas de interesse biotecnológico (DELABONA, 2015).

Várias espécies são conhecidas por atuarem como agentes de biocontrole e micoparasitismo, além de auxiliarem na supressão de patógenos, na resistência e crescimento de plantas. O *Trichoderma* produz diversas enzimas extracelulares capazes de degradar parede celular, como também uma variedade de metabólitos secundários (ISAIAS *et al.*, 2014; VINALE *et al.*, 2014). Além da conhecida atividade antifúngica de *Trichoderma* relatada em vários estudos (LEELAVATHI *et al.*, 2014; SHENTU *et al.*, 2014), estes fungos também podem ser utilizados na biorremediação de metais pesados e derivados de petróleo (ADEBIYI, 2017; DE CARVALHO FONTES, 2015; COCAIGN *et al.*, 2013; KOTA *et al.*, 2014; SHUKLA *et al.*, 2014; HAMZAH *et al.*, 2012).

BORGES DE ASSIS *et al.* (2012) estudaram a degradação de compostos fenólicos em efluente de postos de gasolina pela ação dos fungos *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp. em um reator em batelada, onde observaram grande quantidade de espuma e o crescimento dos fungos, comprovando que as espécies testadas conseguem sobreviver e degradar o resíduo avaliado. OTSUKA (2015) ao avaliar a biodegradação de tolueno por 50 fungos isolados de ambientes associados ao petróleo, percebeu que todos os fungos apresentaram resultados positivos demonstrando assimilação do composto e tolerância a toxicidade da molécula, sendo o *Trichoderrma koningii* o que apresentou o maior crescimento e maior halo, com 6 cm, possuindo assim alta tolerância ao tolueno.

A eficiência do fungo *Trichoderma* spp. tem sido demonstrada em diversos trabalhos, devido suas características em colonizar diferentes tipos de substratos em condições ambientais adversas e também por possuir capacidade em secretar uma extensa variedade de enzimas hidrolíticas (celulases, quinases, glucanases, proteases e outras) e ainda por produzir metabólitos secundários como pironas e terpenos, mostrando-se eficiente inclusive como potencial degradador e mineralizador de hidrocarbonetos do petróleo. Assim, a utilização desses fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* pode tornar-se uma alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados, uma vez que raramente são patogênicos às plantas e/ou animais, inclusive ao homem, sintetizam enzimas com elevado potencial biotecnológico, e ainda, são fundamentais no manejo agrícola sustentável na Amazônia (DA

SILVA PATEKOSKI e PIRES-ZOTTARELLI, 2016; MUKHERJEE *et al.*, 2013; KREDICS *et al.*, 2003; GROLL e WALSH, 2001).

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 COLETA DOS SOLOS

Foram coletadas 16 amostras de solos de profundidades de até dez centímetros, do INPA III, da Reserva Biológica da Campina e das Estações Experimentais de Silvicultura Tropical e Fruticultura Tropical, do INPA situadas no entorno da cidade de Manaus-AM, no período de fevereiro a junho de 2018. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno (estéreis) e encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia – LEBMAM / INPA III.

3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

O isolamento dos fungos foi realizado a partir das amostras dos solos coletadas, por meio da técnica de diluição seriada, onde 10 g de solo foram ressuspensas em 45 mL de água destilada estéril e homogeneizadas por 30 minutos a 200 rpm em agitador rotativo (SOLAB Científica). Após esse procedimento, foram submetidas à diluição seriada de até $1/10^{-3}$ em solução salina (0,85%). Em seguida, alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram plaqueadas, em triplicata, em meio de cultura seletivo para fungos *Trichoderma*: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 g.L⁻¹), K_2HPO_4 (1,0 g.L⁻¹), KCl (0,2 g.L⁻¹), NH_4NO_3 (1,0 g.L⁻¹), Glicose (3,0 g.L⁻¹) e Ágar (20 g.L⁻¹), pH 7,0 (modificado de LEELAVATHI *et al.* (2014)). As placas foram incubadas a 30 °C por cinco dias e à medida que as colônias surgiam, foram isoladas e purificadas utilizando-se meio de cultura BDA – Batata-Dextrose-Ágar (extrato de batata (200 g.L⁻¹), dextrose (18 g.L⁻¹) e ágar (18 g.L⁻¹)), nas mesmas condições de cultivo do isolamento. Para auxiliar a compreensão, a Figura 3 apresenta o processo de isolamento dos fungos.

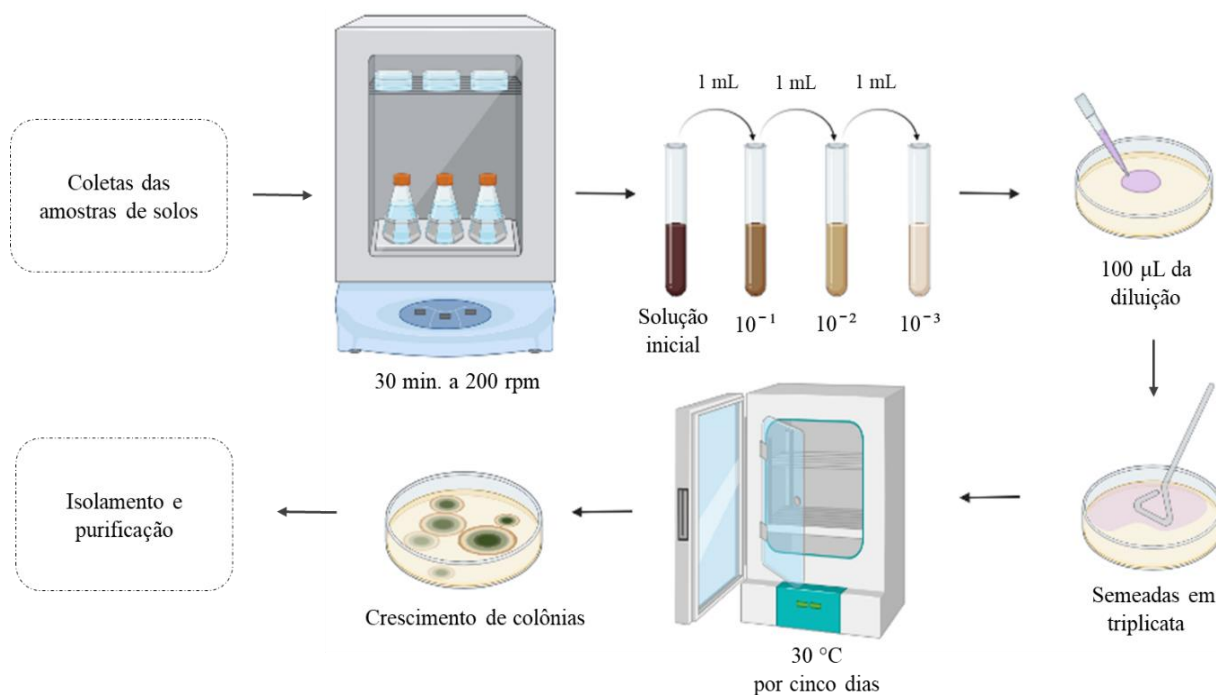


Figura 3. Fluxograma do procedimento seguido para isolamento dos fungos.
Fonte: Autoria própria.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os fungos foram caracterizados segundo a comparação de imagens obtidas por análise em microscópio óptico (40x) e literaturas especializadas. Para tanto, prepararam-se lâminas semipermanentes em lactofenol (azul e algodão), com colônias cultivadas de 5 a 7 dias, em meio BDA. Gotas com aproximadamente 10 µL de azul de algodão, foram depositadas em duplicata sobre lâminas esterilizadas e posteriormente foi realizado esfregaço com cada isolado. Para fixação dos esfregaços, as lâminas foram passadas em chama e uma lamínula foi depositada sobre cada réplica.

As cepas identificadas como *Trichoderma* spp. foram depositadas em triplicatas na coleção do LEBMAM / INPA III, em tubos de vidro contendo meio BDA ou água e, durante o período da pesquisa foram periodicamente subcultivados. Com o objetivo de padronizar os dados das amostras, foi elaborado um modelo de ficha de análise morfológica formando um banco de dados que acompanhará a coleção (Apêndice A).

Nos testes seguintes foram utilizados petróleo e derivados (Nafta, Gasolina, Querosene e Óleo Diesel) provenientes da Bacia Petrolífera Geólogo Pedro de Moura – Urucu/Coari, cedidos pelo Laboratório pertencente à Refinaria Isaac Sabbá (REMAN), localizada na cidade de Manaus, Amazonas e, o Óleo lubrificante comercial para motor (SAE 40).

3.4 CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO

Para testar o potencial de crescimento dos fungos *Trichoderma* na presença de derivados de petróleo, foram utilizados os 43 fungos isolados das amostras de solos situadas no entorno da cidade de Manaus-AM e caracterizados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Trichoderma* (Tabela 2). Os fungos foram rejuvenescidos em placa de Petri contendo meio de cultura BDA: batata (200 g.L⁻¹), dextrose (18 g.L⁻¹) e ágar (18 g.L⁻¹), preparado em pH 7,0. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por cinco dias, até esporulação.

Foram retirados discos de 0,5 cm de diâmetro das culturas puras de cada isolado de *Trichoderma* e depositados no centro de placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio INPA, constituído por: MgSO₄.7H₂O (0,4 g.L⁻¹), Ca(CH₃COO⁻)₂.H₂O (0,02 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄.7H₂O (2,5 g.L⁻¹), FeCl₃.6H₂O (0,05 g.L⁻¹), FeSO₄.7H₂O (0,05 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0,01 g.L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0,01 g.L⁻¹), MnSO₄.7H₂O (0,01 g.L⁻¹), Na₄SeO₃ (0,01 g.L⁻¹) e ágar (15g.L⁻¹) (MOURA e OLIVEIRA 2017), pH 7,0, acrescido com 0,2 mL de um dos derivados de petróleo (nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante). Como controle utilizou-se meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em incubação a 28 ± 2 °C e os fungos avaliados quanto ao crescimento micelial.

As medições foram realizadas a cada 24 horas com o auxílio de paquímetro digital, medindo-se o diâmetro do crescimento micelial. O fundo de cada placa foi marcado para que as medidas sempre fossem no mesmo sentido e as leituras foram concluídas quando o crescimento da colônia cobriu completamente o diâmetro da placa em um dos tratamentos, pelo método adaptado de ZANCAN *et al.* (2012). Os fungos que apresentaram crescimento foram considerados tolerantes aos hidrocarbonetos.

As características macroscópicas dos fungos crescidos na presença dos diferentes derivados de petróleo foram comparadas ao perfil de crescimento apresentado no meio controle. Foram observadas características como coloração, abundância de micélio, pigmentação e esporulação (NAZARETH e MARBANIANG, 2008).

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP

A potencialidade dos 43 fungos para degradar derivados de petróleo foi avaliada através da técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), segundo HANSON *et al.* (1993) e BIDOIA *et al.* (2010), com adaptações. O teste consiste na oxidação da fonte de carbono, que durante o processo de metabolização realizada pelos microrganismos libera elétrons que são transferidos a aceptores. Com a adição do DCPIP ao meio de cultura, este

funciona comoceptor artificial de elétrons capaz de confirmar a atividade degradadora (SANCHES, 2009).

O experimento foi realizado em tubos de ensaio previamente esterilizados, contendo 7,5 mL de meio INPA líquido, $400 \mu\text{L}^{-1}$ do DCPIP, $25 \mu\text{L}^{-1}$ de derivado de petróleo (nafta, querosene, gasolina, óleo diesel e óleo lubrificante) e $100 \mu\text{L}^{-1}$ de suspensão de conídios de isolados de *Trichoderma* spp. padronizados em Câmara de Neubauer a 10^5 células por mL^{-1} . O controle foi feito com o Meio Mineral INPA, o indicador DCPIP e um dos derivados de petróleo. Os tubos de ensaio foram incubados a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e a cada 24 horas foram retiradas alíquotas e submetidas a uma análise quantitativa com o uso de espectrofotometria a 595 nm por um período de cinco dias. O experimento foi realizado em triplicata.

Uma reta padrão foi construída (Figura 4) com quatro concentrações de DCPIP (0,25, 0,5, 0,7, e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) em meio INPA. A partir dos dados de absorbância das concentrações de DCPIP em meio de cultura, foi obtido a equação da reta com grau de confiança de 0,96 (R^2) e expressa pela equação: $y = (3,383x) + 0,7482$, em que “x” representa a concentração de DCPIP em cada isolado, cuja redução indica a degradação de derivados.

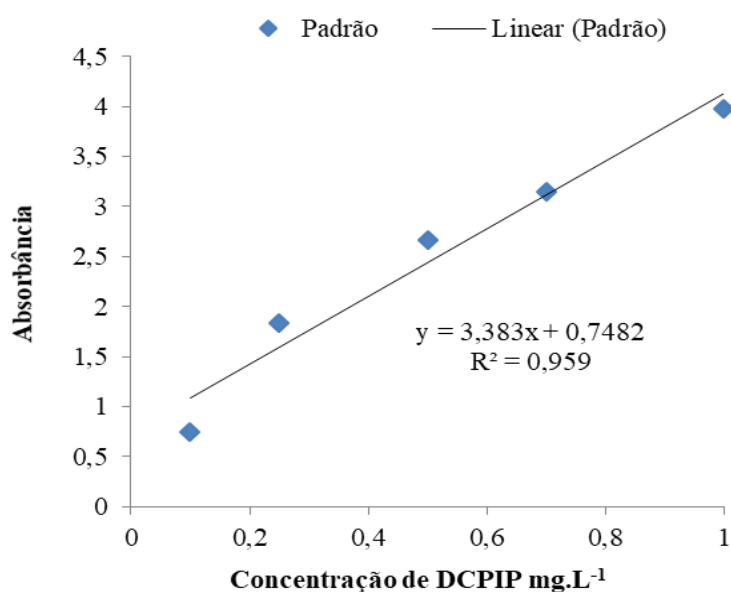


Figura 4. Equação da reta formada para obtenção da concentração de DCPIP (oxirredução) em cada isolado.
Fonte: Autoria própria.

A potencialidade de degradação foi baseada no quanto as amostras descoloriram com relação ao controle de cada fonte de carbono. Os fungos que apresentaram picos de descoloração do DCPIP $\geq 30\%$, com o menor período de avaliação e maior estabilidade da atividade degradadora em todos as fontes de carbono, foram selecionados para os próximos testes.

3.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Para realização dos experimentos foram utilizados *Trichoderma* spp. selecionados como bons degradadores após ensaios com hidrocarbonetos derivados de petróleo. Neste caso, os fungos foram plaqueados em meio BDA (extrato de 200 g.L⁻¹ de batata, 18 g.L⁻¹ de dextrose e 18 g.L⁻¹ de ágar) e após seu crescimento, transferidos para tubos de ensaio contendo caldo nutriente (BD) e incubados por 24h a 28 ± 2 °C, pH 7,0. Posteriormente, foi realizada a suspensão de células de cada cepa e padronizadas em Câmara de Neubauer a 10⁵ células por mL, sendo então transferidos para frascos do tipo Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio mineral INPA (MgSO₄.7H₂O (0,4 g.L⁻¹), Ca(CH₃COO⁻)₂.H₂O (0,02 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄.7H₂O (2,5 g.L⁻¹), FeCl₃.6H₂O (0,05 g.L⁻¹), FeSO₄.7H₂O (0,05 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0,01 g.L⁻¹), CuSO₄.5H₂O (0,01 g.L⁻¹), MnSO₄.7H₂O (0,01 g.L⁻¹), Na₄SeO₃ (0,01 g.L⁻¹) e ágar (15g.L⁻¹)) (MOURA; OLIVEIRA, 2017) ou meio Bushnell Haas - BH - Bushnell Haas (0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, 1,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,0 g.L⁻¹ de NH₄NO₃, 0,05 g.L⁻¹ de FeCl₃), pH 7,0, acrescido de 1,0 mL⁻¹ de petróleo de Urucu; os controles foram frascos contendo os meios de cultura líquido com petróleo sem a presença dos fungos. Os Erlenmeyers foram incubados a 28 ± 2 °C em agitador orbital (SOLAB Científica) a 150 rpm por cinco dias. A produção de biossurfactantes foi avaliada frente as determinações das atividades emulsificantes.

3.6.1 Determinação da atividade emulsificante

As atividades emulsificantes (AE) água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) e índice de emulsificação foram avaliadas para cada isolado e meio mineral, sendo realizada em triplicata. Em tubos de ensaio, adicionou-se 3,5 mL⁻¹ do extrato bruto dos isolados de *Trichoderma* spp. juntamente a 3,5 mL⁻¹ de petróleo de Urucu, misturando em agitador Vórtex a 700 rpm por 2 min. e conservados em repouso.

A leitura da atividade emulsificante A/O foi realizada após 24h com paquímetro digital, a partir da altura da camada de emulsão (CE) formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente do óleo) e, com o objetivo de verificar a relação centesimal entre as alturas foi avaliado o índice de emulsificação, de acordo com as Equações 1 e 2. Para constatar a estabilidade da emulsão formada, a atividade emulsificante A/O também foi verificada às 48 h, seguindo métodos adaptados de MARTINS *et al.* (2006) e COOPER e GOLDENBERG (1987). A atividade O/A foi determinada pela leitura do meio emulsificado após 48 h de repouso em espectrofotômetro a 610 nm de absorbância, medida em unidade (Equação 3) (JOHNSON *et al.*, 1992). Foi preparado um branco misturando água e petróleo,

procedendo-se da mesma forma que para as amostras. Todas as leituras foram realizadas subtraindo o valor do branco pelo da amostra, obtendo assim, atividade emulsificante A/O e O/A.

Com base nos resultados obtidos também foram avaliadas as produtividades das emulsões formadas em relação ao tempo (Equação 4). E o pH da fase aquosa de cada amostra foi medido às 24h e 48h para verificar se houve interferência neste parâmetro químico. De forma a elucidar o processo de avaliação da atividade de emulsificação, a Figura 5 apresenta uma representação esquemática detalhada.

$$AE_{(A/O)} = (CE_{amostra} - CE_{branco}) \quad (1)$$

$$IE \% = \frac{CE}{h_{emulsão}} \times 100 \quad (2)$$

$$AE_{(O/A)} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \quad (3)$$

$$P_{(E)} = \frac{A_f - A_i}{t} \quad (4)$$

Onde: AE = atividade emulsificante; CE = camada da emulsão; $h_{emulsão}$ = altura total da emulsão mais óleo; IE% = índice de emulsificação; Abs = Absorbância; UE = unidade de emulsificação; A/O = água em óleo (UE); O/A = óleo em água (UE); P = produtividade (UE/d); E = emulsão; A_m = atividade final; A_i = atividade inicial; t = tempo.

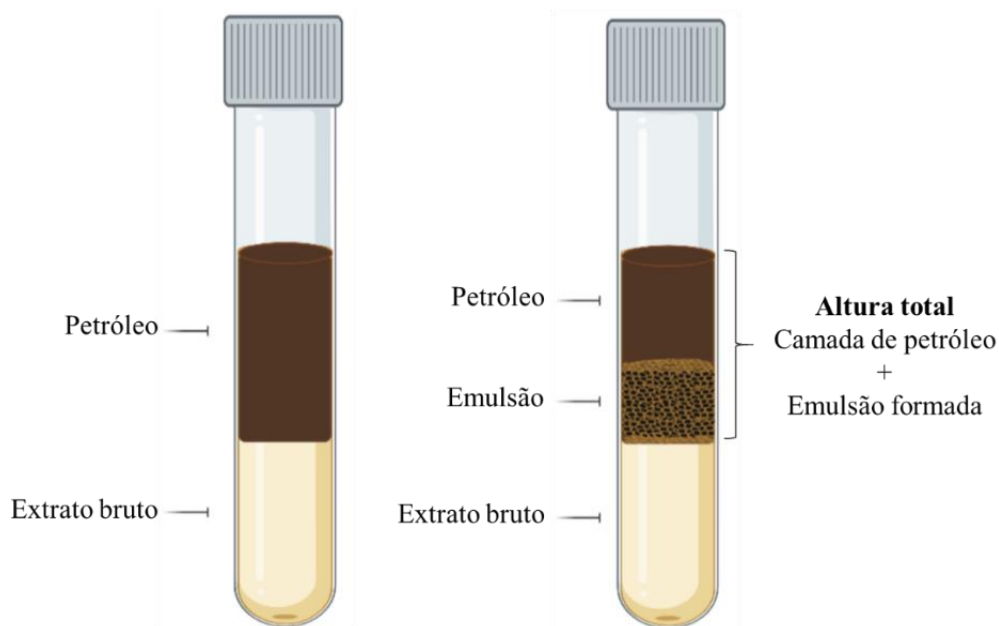


Figura 5. Representação esquemática do teste de atividade emulsificante.

Fonte: Autoria própria.

3.7 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram posteriormente avaliados quanto a capacidade de degradação de petróleo. Para isto, em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL⁻¹, foram adicionados meio mineral INPA (MOURA; OLIVEIRA, 2017) ou Bushnell Haas - BH, pH 7,0, acrescidos de 5,0 mL⁻¹ de petróleo como fonte de carbono e suspensão de células padronizadas a 10⁵ por mL⁻¹ em Câmara de Neubauer, totalizando um volume final de 100 mL⁻¹. O ensaio foi realizado em triplicada, sendo utilizados como controles frascos contendo os meios com adição de petróleo e sem os fungos. Os frascos foram incubados em agitador orbital (SOLAB Científica) a 150 rpm, a 28 ± 2, por cinco dias.

A degradação de hidrocarbonetos foi avaliada a partir da redução do óleo, onde o conteúdo de cada Erlenmeyer foi totalmente transferido para proveta de 250 mL⁻¹ e posteriormente aferido o volume do óleo. O valor do controle foi subtraído da amostra, obtendo assim, o valor degradado do petróleo para os tratamentos nos diferentes meios.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente usando o programa IBM SPSS *Statistics*, versão 27.0.1, para Windows. Para isso, os resultados foram submetidos a um teste de homogeneidade de variância mediante a prova de Levene, depois de comprovar a normalidade com a prova de Shapiro-Wilk. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com os dados e, quando o teste F foi significativo, procedeu-se uma análise de comparação de médias pelo teste Tukey a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram isolados 96 fungos das 16 amostras de solos. As características macro e microscópicas de suas culturas em meio BDA, comparadas com as descritas e ilustradas na literatura (BISSETT, 1984; 1991; RIFAI, 1969), resultaram na identificação de *Trichoderma* spp., além de fungos de outros gêneros, entre os quais: *Aspergillus* e *Fusarium* (Figura 6).

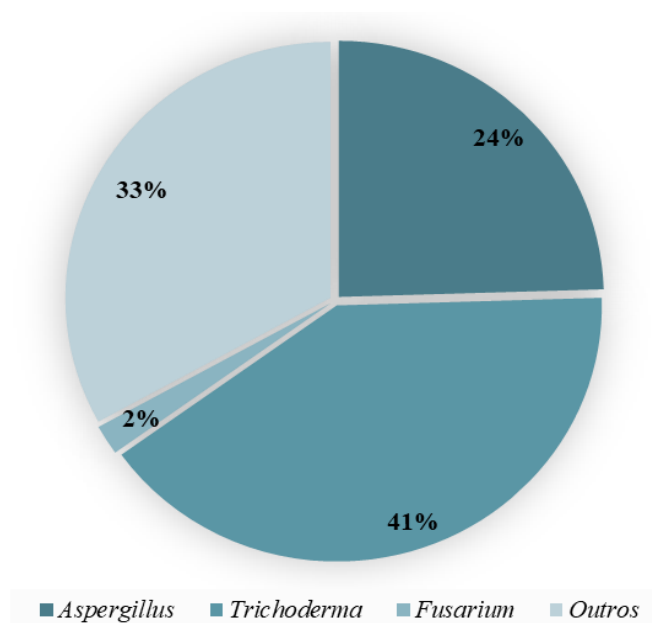


Figura 6. Percentual de ocorrência de gêneros fúngicos isolados de 16 amostras de solos coletadas no entorno da cidade de Manaus-AM.

Fonte: Autoria própria.

Os fungos identificados como pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. apresentaram características macroscópicas como: colônias jovens (dois dias) com micélio branco, filamentosas e aspecto aveludado. Durante os cinco dias de crescimento foram assumindo colorações: verde, verde com bordas brancas, preta e branca (Figura 7).

As observações micromorfológicas ao microscópio foram satisfatórias, contudo, devido os isolados apresentarem diferentes velocidades no desenvolvimento de estruturas reprodutivas, tornando uma avaliação sistemática e regular difícil. As características microscópicas observadas foram: hifas septadas e hialinas, conídios globosos ou cilíndricos e fiálides com e sem produção de conídios.

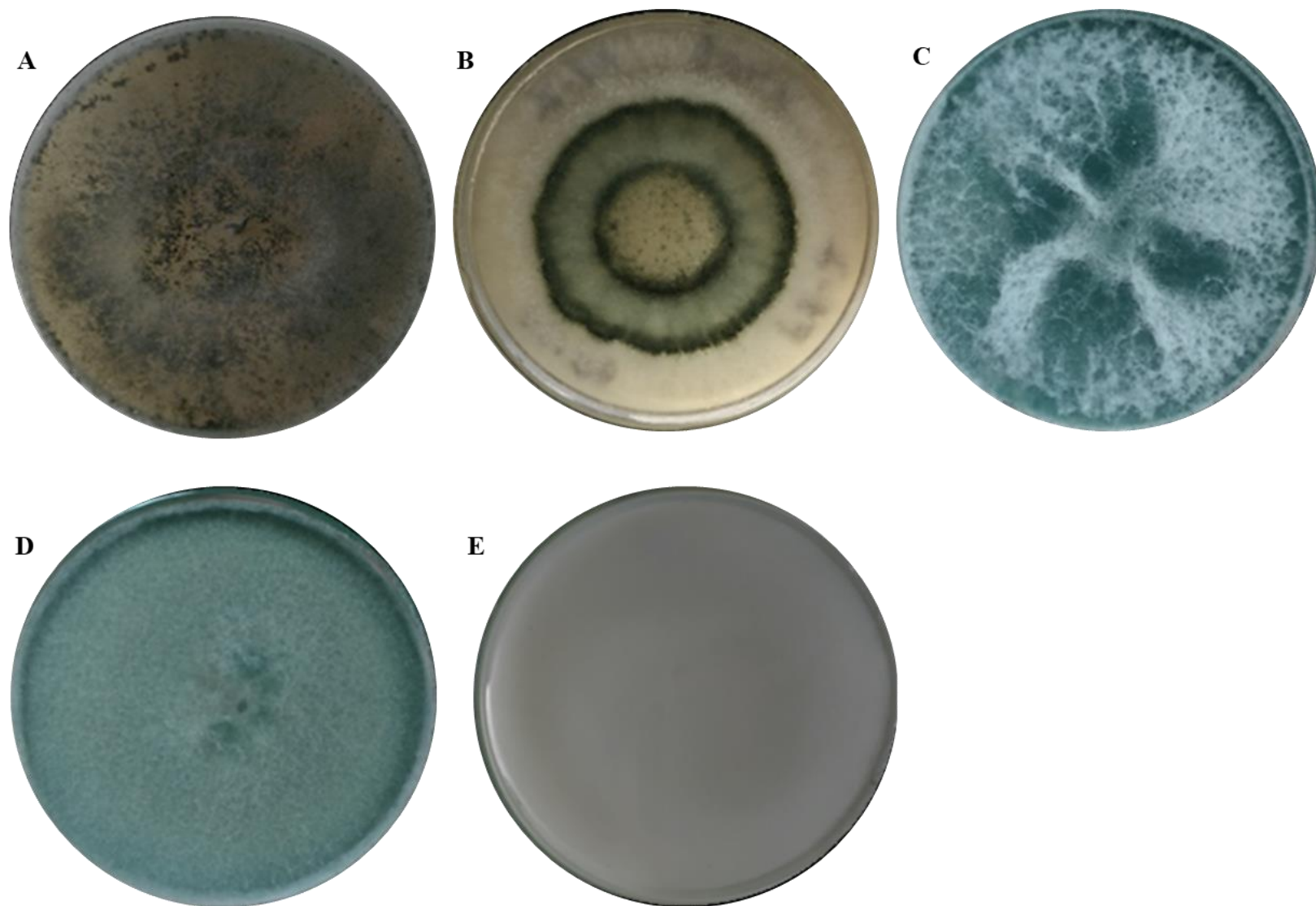


Figura 7. Colônias de *Trichoderma* spp. com 5 dias de crescimento em meio BDA, a 28 ± 2 °C. (A) INPA F01, (B) INPA F03, (C) INPA F14, (D) INPA F29 e (E) INPA F40. Fonte: Autoria própria.

A dificuldade na visualização microscópica pode estar relacionada ao processo de conidiogênese (formação de conídios), que nestes fungos ocorre de maneira irregular. Isso impede uma visualização clara da distribuição das fiálides ao longo do conidióforo (CORABIL-ADELL, 2004).

Os resultados obtidos demonstram a diversidade de populações de *Trichoderma* existentes em cada amostra de solo, observados a partir das variações morfológicas das estruturas reprodutoras. Das 16 (dezesesseis) amostras de solos, 11 (onze) apresentaram crescimento de fungos do gênero *Trichoderma*, totalizando 43 fungos pertencentes a este gênero.

Segundo, DRUZHININA *et al.* (2011) e HARMAN *et al.* (2004) o gênero *Trichoderma* é encontrado em solos de regiões tropicais e temperadas, conhecido como colonizador de sucesso de seus *habitats*. Esta característica deve-se à sua potente maquinaria de degradação do substrato, que é realizada através de extensa variedade de enzimas extracelulares (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010), o que explica o grande número de fungos isolados destes solos. A Tabela 1 apresenta os números de identificação dos isolados (código de depósito na coleção do LEBMAM) com as respectivas coordenadas e plantas-ponto de referência.

Tabela 1. Fungos adquiridos através do isolamento de solos e seus respectivos locais de coleta.

<i>Trichoderma</i> spp.	Local	Planta/ Ponto de Referência
INPA F01, INPA F02, INPA F03, INPA F04, INPA F05, INPA F06, INPA F07, INPA F08, INPA F09, INPA F10, INPA F11	Manaus; INPA, Campus III /V8 S 03° 05' 29,8" W 059° 59' 39,2"	<i>Dipteryx odorata</i> (Cumarú)
INPA F12, INPA F13, INPA F14, INPA F15, INPA F16, INPA F17	Manaus; INPA, Campus III /V8 S 03° 05' 28,5" W 059° 59' 39,2"	<i>Mauritia flexuosa</i> (Buriti)
INPA F18, INPA F19	Manaus; INPA, Campus III /V8 S 03° 05' 31,9" W 059° 59' 38,6"	<i>Antocarpus altilis</i> (Fruta-pão)
INPA F20, INPA F21	Manaus; INPA, Campus III /V8 S 03° 05' 33,7" W 059° 59' 39,7"	<i>Bocageopsis multiflora</i> (Envira preta)
INPA F22	Manaus; INPA, Campus III /V8 S 03° 05' 29,9" W 059° 59' 31,8"	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Faveira de macaco)
INPA F23, INPA F24, INPA F25, INPA F26, INPA F27	Estação Experimental de Silvicultura, INPA, BR 174, Amazonas S 02° 36' 00,9" W 060° 02' 16,9"	<i>Bellucia grossularioides</i> (Goiaba de anta)

INPA F28, INPA F29, INPA F30, INPA F31, INPA F32, INPA F33	Estação Experimental de Silvicultura, INPA, BR 174, Amazonas S 02°36' 01,0" W 060°02' 18,9"	<i>Bertholletia excelsa</i> (Castanha-do-Brasil)
INPA F34, INPA F35, INPA F36, INPA F37, INPA F38	Estação Experimental de Silvicultura, INPA, BR 174, Amazonas S 02°36' 58,4" W 060°02' 22,3"	<i>Vochysia haenkeana</i> Mart. (Faveira escorrega macaco)
INPA F39	Reserva da Campina, INPA, BR 174, Amazonas S 02°35' 21,8" W 060°01' 53,7"	<i>Ormosia coccinea</i> (Tento)
INPA F40	Reserva da Campina, INPA, BR 174, Amazonas S 02°35' 20,7" W 060°01' 54,3"	<i>Aldina heterophylla</i> (Macucu de paca)
INPA F41, INPA F42, INPA F43	Reserva da Campina, INPA, BR 174, Amazonas S 02°35' 19,1" W 060°01' 59,4"	<i>Coupeia edulis</i> Prance. (Castanha de cutia)

Fonte: Autoria própria.

A utilização da morfologia na identificação tem sido efetiva ao nível de gênero, mas a diferenciação em espécies é mais complexa devido a diversas características distintas de cada espécie, resultando numa chave muito artificial e sujeita ao subjetivismo (CAI e DRUZHININA, 2021; CORABI-ADELL, 2004). KUHLS *et al.* (1997) relataram que apesar da elevada importância econômica e ecológica de *Trichoderma* spp., sua taxonomia ainda não está completamente esclarecida. Os estudos clássicos, baseados na morfologia não resultaram numa revisão compreensiva e satisfatória, tornando assim, o detalhamento das características morfológicas destes fungos, aspecto fundamental para a triagem de espécies diferentes.

4.2 CRESCIMENTO MICEIAL EM MEIO SÓLIDO

A Tabela 2 apresenta o crescimento micelial de *Trichoderma* nos meios BDA (controle) e INPA com as fontes de carbono: nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante, nos quatro períodos avaliados (24, 48, 72 e 96 horas), onde foram alcançados os seguintes resultados:

No meio BDA, com 24h de incubação, os fungos apresentaram crescimentos de 0,9 a 3,4 cm, com os maiores médias observadas com as cepas INPA F13 e INPA F17 com 3,4 e 3,0 cm, respectivamente. Após 48h, a cepa INPA F40 mostrou o maior crescimento com 5,7 cm, seguido por INPA F17 com 5,5 cm de diâmetro. O menor crescimento foi o INPA F25 com 3,3

cm. E após 96h de avaliação, todos os 43 isolados apresentaram crescimentos entre 8,1 e 9,0 cm. O menor crescimento observado foi com INPA F27, com 8,1 cm de diâmetro.

O fungo que mostrou maior crescimento no meio contendo nafta como fonte de carbono foi o INPA F13, com 4,2 cm de diâmetro, seguido por INPA F17 com 3,5 cm com apenas 24 horas de incubação. Nessa fase inicial, os isolados INPA F15 e INPA F16 não mostraram crescimento visível, mas com 48 horas de crescimento seus diâmetros atingiram 3,5 e 3,1 cm, respectivamente. Após 96 horas de incubação, observou-se que os isolados apresentaram diâmetros variando de 6,8 até 9,0 cm, sendo que dos 43 testados, 13 conseguiram preencher a placa inteira (9,0 cm de diâmetro).

Ao utilizar a gasolina como fonte de carbono, 41 fungos apresentaram pouco crescimento após 24h de incubação, sendo que dentre estes, as cepas INPA F02, INPA F04 e INPA F15 mostraram crescimento igual zero e as cepas INPA F06 e INPA F24 apresentaram os melhores crescimentos, com 4,9 e 5,1 cm. Após 72h de incubação, um total de 19 fungos estavam com crescimento moderado e 24 com crescimento elevado. Após 96 h, 40 fungos apresentaram crescimento elevado, de 6,0 a 9,0 cm, sendo que apenas os isolados INPA F14, INPA F28 e INPA F38 tiveram crescimento abaixo de 6,0 cm.

No querosene, os fungos que mostraram os maiores crescimentos foram o INPA F16 e INPA F32 com 2,7 a 2,8 cm, enquanto que INPA F01, INPA F09, INPA F18, INPA F38 e INPA F40 não mostraram crescimento visível. Após 48 h, a cepa INPA F12 se sobressaiu, com 6,3 cm, seguido pelas cepas INPA F11, F13, F33, F36 e F43 com diâmetros entre 5,5 e 5,7 cm. E após 96 horas de incubação os 43 fungos mostraram crescimentos, variando entre 7,1 e 9,0 cm, sobressaindo as cepas INPA F01, F05, F10, F11, F28, F32, F33, F34, F37, F38 e F43, todos com 9,0 cm de diâmetro.

Ao se usar o óleo diesel como fonte de carbono, observou-se com 24h de incubação, que apenas INPA F32 não apresentou crescimento, as demais cepas apresentaram crescimento entre 0,3 e 2,8 cm (baixo crescimento). E após 96h de incubação, sete cepas apresentaram crescimento de 3,9 a 5,7 cm (INPA F01, INPA F03, INPA F06, INPA F07, INPA F29, INPA F30 e INPA F38) e 36 crescimentos entre 6,2 e 9,0 cm.

Já em óleo lubrificante, após 24h de incubação, os isolados que mostraram os maiores crescimentos foram o INPA F12, INPA F20 e INPA F40 com 3,0 a 3,3 cm, enquanto que o isolado INPA F02 não mostrou crescimento visível. Após 48h, os isolados INPA F14 e INPA F17 se sobressaíram com 5,8 e 5,9 cm, seguidos pelas cepas INPA F12, F30 e F34 com diâmetros entre 5,1 a 5,6 cm. E após 96h, os 43 isolados apresentaram crescimento variando entre 6,5 e 9,0 cm, sobressaindo os fungos INPA F27, INPA F40 e INPA F42 com 8,9 a 9,0 cm de diâmetro, atingindo o diâmetro da placa de Petri.

Ao comparar as médias de crescimento levando-se em consideração as fontes de carbono, dentro de cada período de incubação, observa-se que ao longo do tempo os fungos testados cresceram significativamente independente da fonte, com diâmetros observados após 24h de incubação variando de 1,1 a 2,1 cm, em 48h de 2,7 a 4,6 cm, 72h de 5,6 a 7,5 cm e às 96h de 7,5 a 8,9 cm. O crescimento rápido (4 dias) destes fungos na presença dos derivados de petróleo demonstra que os mesmos puderam assimilar e tolerar a toxicidade das moléculas desses compostos.

Em relação as características macromorfológicas, a abundância de micelial variou conforme a fonte de carbono. Em BDA por ser um meio de cultura ideal para seu desenvolvimento, os fungos apresentaram excelente produção micelial, enquanto que em nafta, gasolina e querosene para todos os 43 *Trichoderma* spp. houve uma diminuição na abundância de micélio e em óleo diesel e óleo lubrificante a produção micelial foi maior entre os derivados de petróleo. As demais características dos fungos se mantiveram inalteráveis nos tratamentos quando comparados ao controle (Figura 8).

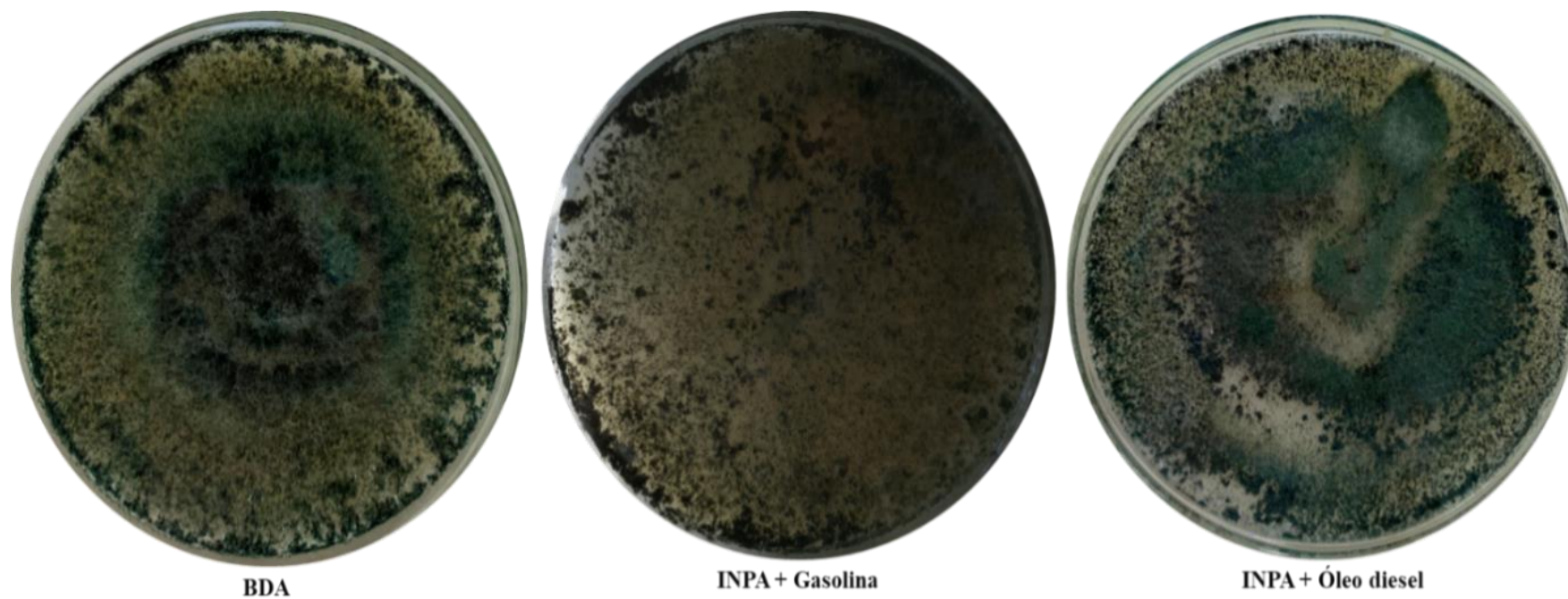


Figura 8. Diferenças observadas no crescimento micelial de *Trichoderma* spp. (isolado INPA F41) em diferentes fontes de carbono, após 96h de incubação, em comparação ao controle. Fonte: Autoria própria.

Tabela 2. Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em meio BDA (controle) e meio INPA com os diferentes derivados de petróleo.

Isolados	24 horas						48 horas						72 horas						96 horas						
	INPA*						INPA						INPA						INPA						
	BDA	N	G	Q	D	L	BDA	N	G	Q	D	L	BDA	N	G	Q	D	L	BDA	N	G	Q	D	L	
INPA**	F01	2,1 ^{bc}	1,9 ^d	0,9 ^{de}	0,0 ^e	1,2 ^{bc}	0,9 ^d	4,9 ^{ab}	3,0 ^{de}	2,3 ^d	5,1 ^{ab}	3,3 ^{bc}	4,2 ^b	7,9 ^b	7,7 ^b	5,6 ^{cd}	6,0 ^b	5,1 ^b	6,4 ^{ab}	9,0 ^a	8,9 ^a	8,9 ^a	9,0 ^a	5,2 ^d	7,8 ^b
	F02	1,8 ^c	1,1 ^{de}	0,0 ^e	1,5 ^{bc}	2,4 ^a	0,0 ^e	4,1 ^{bc}	3,7 ^{cd}	2,4 ^d	3,5 ^c	3,5 ^{bc}	3,5 ^c	7,1 ^{bc}	7,1 ^{bc}	6,8 ^b	6,2 ^{ab}	5,7 ^{ab}	5,6 ^b	9,0 ^a	8,5 ^{ab}	8,5 ^{ab}	8,7 ^a	9,0 ^a	6,9 ^c
	F03	2,2 ^{bc}	1,6 ^d	1,2 ^{cd}	1,8 ^b	2,6 ^a	1,2 ^{cd}	4,8 ^{ab}	6,7 ^a	2,7 ^{cd}	5,5 ^{ab}	3,1 ^{bc}	4,3 ^b	8,0 ^b	7,6 ^b	6,9 ^b	6,7 ^a	6,3 ^{ab}	6,4 ^{ab}	9,0 ^a	8,3 ^b	8,2 ^b	8,3 ^{ab}	9,0 ^a	7,9 ^b
	F04	2,4 ^{bc}	1,9 ^d	0,0 ^e	0,4 ^{de}	0,5 ^{cd}	1,0 ^{cd}	5,0 ^{ab}	4,4 ^c	2,9 ^{cd}	4,8 ^b	3,8 ^b	4,8 ^{ab}	8,0 ^b	5,9 ^d	5,9 ^{cd}	6,2 ^{ab}	5,0 ^b	6,4 ^{ab}	9,0 ^a	8,6 ^{ab}	8,0 ^b	8,3 ^{ab}	5,7 ^d	7,6 ^b
	F05	2,0 ^c	1,6 ^d	0,8 ^{de}	1,0 ^c	1,7 ^b	0,8 ^d	3,7 ^d	2,8 ^{de}	2,4 ^d	4,8 ^b	3,2 ^{bc}	4,0 ^{bc}	5,8 ^{de}	4,0 ^f	6,5 ^c	5,9 ^b	5,4 ^{ab}	5,3 ^{bc}	9,0 ^a	9,0 ^a	8,9 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	8,1 ^{ab}
	F06	2,0 ^c	1,1 ^{de}	4,9 ^{ab}	0,5 ^{de}	0,4 ^{cd}	1,1 ^{cd}	4,1 ^{bc}	3,3 ^d	5,8 ^{ab}	1,9 ^e	2,9 ^c	4,0 ^{bc}	7,1 ^{bc}	5,2 ^e	6,5 ^c	6,2 ^{ab}	5,0 ^b	5,9 ^b	8,9 ^a	8,8 ^a	8,5 ^{ab}	8,7 ^a	5,5 ^d	8,1 ^{ab}
	F07	2,0 ^c	1,1 ^{de}	0,8 ^{de}	1,2 ^{bc}	0,3 ^{cd}	0,8 ^d	4,3 ^{bc}	2,6 ^e	2,9 ^{cd}	4,8 ^b	3,2 ^{bc}	4,0 ^{bc}	7,4 ^{bc}	6,0 ^d	6,4 ^c	6,2 ^{ab}	5,2 ^b	6,0 ^b	9,0 ^a	8,6 ^{ab}	7,6 ^c	8,1 ^{ab}	5,7 ^d	8,0 ^{ab}
	F08	1,8 ^c	1,0 ^{de}	0,9 ^{de}	0,9 ^d	0,7 ^{cd}	0,9 ^d	3,7 ^d	2,2 ^{ef}	2,5 ^{cd}	4,4 ^{bc}	2,6 ^c	3,5 ^c	6,4 ^{cd}	5,1 ^e	6,3 ^c	5,8 ^b	5,4 ^{ab}	5,3 ^{bc}	9,0 ^a	8,7 ^{ab}	6,7 ^d	7,7 ^b	9,0 ^a	7,5 ^b
	F09	2,0 ^c	1,4 ^{de}	1,4 ^{cd}	0,0 ^e	0,3 ^{cd}	1,4 ^{cd}	4,3 ^{bc}	2,6 ^e	2,5 ^{cd}	4,3 ^{bc}	2,5 ^{cd}	3,9 ^{bc}	7,1 ^{bc}	6,7 ^c	5,4	5,7 ^b	5,5 ^{ab}	5,9 ^b	9,0 ^a	8,5 ^{ab}	7,2 ^c	7,9 ^b	9,0 ^a	7,7 ^b
	F10	1,9 ^c	1,4 ^{de}	1,3 ^{cd}	1,9 ^b	1,2 ^{bc}	1,3 ^{cd}	5,1 ^a	4,1 ^c	2,3 ^d	5,0 ^{ab}	2,4 ^{cd}	3,7 ^c	8,8 ^a	8,6 ^a	7,0 ^b	6,8 ^a	6,5 ^a	6,6 ^{ab}	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	8,8 ^a	7,4 ^b
	F11	2,1 ^{bc}	1,4 ^{de}	1,4 ^{cd}	1,1 ^{bc}	1,7 ^b	1,4 ^{cd}	4,8 ^{ab}	2,5 ^e	2,8 ^{cd}	5,6 ^{ab}	2,8 ^c	4,2 ^b	8,2 ^{ab}	7,3 ^{bc}	6,3 ^c	6,3 ^{ab}	6,0 ^{ab}	6,3 ^{ab}	8,9 ^a	9,0 ^a	8,9 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	7,2 ^b
	F12	2,6 ^{bc}	2,0 ^d	1,2 ^{cd}	1,2 ^{bc}	0,3 ^{cd}	3,2 ^a	5,2 ^a	3,2 ^d	3,1 ^{cd}	6,3 ^a	4,9 ^a	5,1 ^{ab}	8,4 ^{ab}	7,7 ^b	7,1 ^b	6,9 ^a	6,5 ^a	6,6 ^{ab}	9,0 ^a	8,5 ^{ab}	8,3 ^b	8,4 ^{ab}	6,9 ^c	7,6 ^b
	F13	3,4 ^a	4,2 ^a	0,9 ^{de}	1,9 ^b	2,0 ^{ab}	2,9 ^{ab}	4,8 ^{ab}	5,3 ^b	2,6 ^{cd}	5,7 ^{ab}	3,9 ^b	4,8 ^{ab}	5,4 ^e	5,4 ^e	6,5 ^c	6,1 ^{ab}	5,7 ^{ab}	5,6 ^b	8,5 ^{ab}	7,5 ^c	6,1 ^{de}	8,0 ^b	7,6 ^{bc}	7,2 ^b
	F14	2,9 ^{ab}	2,8 ^c	0,7 ^{de}	0,3 ^{de}	2,8 ^a	1,7 ^c	5,1 ^a	4,7 ^c	3,0 ^{cd}	2,5 ^d	4,1 ^{ab}	5,8 ^a	7,4 ^{bc}	6,4 ^{cd}	5,6 ^{cd}	5,9 ^b	5,8 ^{ab}	6,1 ^{ab}	9,0 ^a	8,8 ^a	5,9 ^{de}	7,9 ^b	8,9 ^a	6,8 ^c
	F15	0,9 ^d	0,0 ^f	0,0 ^e	1,3 ^{bc}	0,7 ^{cd}	1,0 ^{cd}	3,6 ^d	3,5 ^d	1,8 ^f	1,8 ^e	1,8 ^e	1,8 ^e	7,2 ^c	6,7 ^c	4,9 ^d	5,1 ^{bc}	4,8 ^b	5,2 ^{bc}	9,0 ^a	8,5 ^{ab}	6,2 ^{de}	7,4 ^c	8,9 ^a	6,5 ^{cd}
	F16	1,1 ^d	0,0 ^f	1,0 ^{cd}	2,7 ^a	1,0 ^{bc}	1,0 ^{cd}	4,0 ^{bc}	3,1 ^{de}	2,1 ^d	3,1 ^c	1,1 ^f	2,1 ^{de}	7,9 ^b	6,4 ^{cd}	5,0 ^d	5,5 ^b	5,3 ^b	6,0 ^b	9,0 ^a	8,3 ^b	8,7 ^a	8,5 ^{ab}	9,0 ^a	8,0 ^b
	F17	3,0 ^{ab}	3,5 ^b	1,0 ^{cd}	0,6 ^{de}	2,6 ^a	1,0 ^{cd}	5,5 ^a	5,0 ^b	2,4 ^d	2,9 ^{cd}	4,9 ^a	5,9 ^a	7,5 ^{bc}	6,5 ^{cd}	5,4 ^{cd}	5,9 ^b	5,9 ^{ab}	6,4 ^{ab}	9,0 ^a	7,6 ^c	7,3 ^c	7,6 ^{bc}	9,0 ^a	7,1 ^b
	F18	1,6 ^c	1,6 ^d	1,5 ^{cd}	0,0 ^e	0,8 ^{cd}	1,5 ^c	4,1 ^{bc}	2,9 ^{de}	1,6 ^{ef}	4,7 ^b	1,7 ^f	3,2 ^{cd}	6,6 ^{cd}	5,7 ^{de}	5,6 ^{cd}	5,6 ^b	5,3 ^b	5,5 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a	6,6 ^d	7,8 ^b	8,7 ^a	7,1 ^b
	F19	1,7 ^c	1,1 ^{de}	1,0 ^{cd}	0,9 ^d	0,7 ^{cd}	1,0 ^{cd}	4,5 ^{bc}	3,8 ^{cd}	2,2 ^d	4,3 ^{bc}	2,3 ^{cd}	3,3 ^{cd}	7,9 ^b	6,8 ^c	5,4 ^{cd}	5,9 ^b	5,7 ^{ab}	6,3 ^{ab}	8,8 ^a	8,5 ^{ab}	6,4 ^d	8,5 ^{ab}	7,0 ^c	8,1 ^{ab}
	F20	2,2 ^{bc}	2,0 ^d	0,9 ^{de}	1,3 ^{bc}	2,5 ^a	3,0 ^{ab}	4,8 ^{ab}	6,2 ^a	2,4 ^d	3,3 ^c	3,5 ^{bc}	4,4 ^b	7,5 ^{bc}	7,5 ^{bc}	3,5 ^f	4,9 ^c	5,1 ^b	6,2 ^{ab}	9,0 ^a	9,0 ^a	5,9 ^{de}	7,5 ^{bc}	8,7 ^a	7,5 ^b
	F21	2,4 ^{bc}	2,0 ^d	1,1 ^{cd}	1,6 ^b	2,6 ^a	1,1 ^{cd}	4,8 ^{ab}	3,1 ^{de}	2,7 ^{cd}	3,8 ^{bc}	3,6 ^{bc}	4,7 ^{ab}	7,6 ^{bc}	6,5 ^{cd}	5,0 ^d	5,5 ^b	5,4 ^{ab}	5,9 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a	7,2 ^c	8,1 ^{ab}	8,5 ^a	6,5 ^{cd}
	F22	2,0 ^c	1,2 ^{de}	1,3 ^{cd}	0,9 ^d	1,6 ^b	1,3 ^{cd}	4,6 ^b	2,5 ^e	2,7 ^{cd}	5,2 ^{ab}	2,6 ^c	3,9 ^{bc}	8,0 ^b	6,8 ^c	6,4 ^c	6,3 ^{ab}	5,9 ^{ab}	6,1 ^{ab}	9,0 ^a	7,4 ^c	8,1 ^b	8,8 ^a	8,7 ^a	7,2 ^b
	F23	2,0 ^c	1,3 ^{de}	1,2 ^{cd}	0,9 ^d	1,3 ^{bc}	1,2 ^{cd}	4,3 ^{bc}	3,4 ^d	2,6 ^{cd}	5,1 ^{ab}	2,7 ^c	3,9 ^{bc}	7,3 ^{bc}	6,5 ^{cd}	5,2 ^{cd}	5,5 ^b	5,3 ^b	5,7 ^b	8,9 ^a	7,6 ^c	6,9 ^{cd}	7,3 ^c	7,0 ^c	6,9 ^c
	F24	2,0 ^c	1,0 ^{de}	5,1 ^a	1,3 ^{bc}	0,4 ^{cd}	2,9 ^{ab}	3,9 ^{bc}	2,9 ^{de}	6,0 ^a	3,9 ^{bc}	1,1 ^f	4,0 ^{bc}	6,7 ^c	5,9 ^d	6,6 ^c	5,8 ^b	5,4 ^{ab}	5,5 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a	7,8 ^{bc}	8,4 ^{ab}	8,9 ^a	7,4 ^b
	F25	2,0 ^c	1,1 ^{de}	1,2 ^{cd}	1,9 ^b	1,1 ^{bc}	1,2 ^{cd}	3,3 ^d	3,9 ^{cd}	2,8 ^{cd}	5,1 ^{ab}	2,7 ^c	3,9 ^{bc}	5,4 ^e	4,5 ^{fg}	8,0 ^a	6,3 ^{ab}	5,5 ^{ab}	4,6 ^c	9,0 ^a	6,8 ^d	9,0 ^a	7,9 ^b	8,7 ^a	6,5 ^{cd}
	F26	2,0 ^c	1,2 ^{de}	1,4 ^{cd}	1,7 ^b	0,8 ^{cd}	1,4 ^{cd}	4,0 ^{bc}	4,2 ^c	2,7 ^{cd}	5,3 ^{ab}	2,5 ^{cd}	3,9 ^{bc}	6,7 ^c	5,9 ^d	7,6 ^{ab}	6,7 ^a	6,1 ^{ab}	5,8 ^b	9,0 ^a	7,1 ^{cd}	9,0 ^a	8,1 ^{ab}	6,6 ^c	8,6 ^a
	F27	2,3 ^{bc}	1,1 ^{de}	1,1 ^{cd}	1,3 ^{bc}	2,7 ^a	1,1 ^{cd}	4,3 ^{bc}	4,8 ^c	3,4 ^{bc}	2,6 ^d	3,4 ^{bc}	4,5 ^b	7,4 ^{bc}	6,5 ^{cd}	4,9 ^d	5,6 ^b	5,5 ^{ab}	6,3 ^{ab}	8,1 ^b	8,7 ^{ab}	7,1 ^c	7,9 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a
	F28	2,2 ^{bc}	1,0 ^{de}	1,1 ^{cd}	1,5 ^{bc}	1,7 ^b	2,1 ^b	4,2 ^{bc}	4,9 ^c	3,3 ^{bc}	5,4 ^{ab}	3,2 ^{bc}	4,3 ^b	7,4 ^{bc}	3,8 ^f	5,8 ^{cd}	6,0 ^b	5,7 ^{ab}	6,1 ^{ab}	9,0 ^a	8,3 ^b	5,0 ^e	9,0 ^a	7,8 ^{bc}	8,4 ^a
	F29	1,9 ^c	1,2 ^{de}	1,2 ^{cd}	1,0 ^c	2,4 ^a	1,2 ^{cd}	4,9 ^{ab}	2,9 ^{de}	2,6 ^{cd}	4,0 ^{bc}	2,6 ^c	3,8 ^{bc}	8,5 ^{ab}	5,6 ^{de}	6,3 ^c	6,3 ^{ab}	3,5 ^d	6,3 ^{ab}	9,0 ^a	9,0 ^a	7,8 ^{bc}	8,4 ^{ab}	3,9 ^e	6,9 ^c
	F30	2,8 ^b	1,9 ^d	1,0 ^{cd}	1,5 ^{bc}	0,7 ^{cd}	2,0 ^{bc}	4,6 ^b	4,1 ^c	3,7 ^b	3,6 ^{bc}	3,6 ^b	5,6 ^a	7,2 ^{bc}	6,4 ^{cd}	7,5 ^{ab}	6,7 ^a	4,3 ^c	5,8 ^b	8,8 ^a	7,4 ^c	8,5 ^{ab}	9,0 ^a	5,1 ^d	6,7 ^{cd}
	F31	1,8 ^c	1,4 ^{de}	1,3 ^{cd}	1,3 ^{bc}	0,4 ^{cd}	1,3 ^{cd}	4,5 ^{bc}	3,2 ^{de}	2,1 ^d	4,8 ^b	2,2 ^{cd}	3,5 ^d	7,5 ^{bc}	6,4 ^{cd}	7,8 ^{ab}	6,9 ^a	6,3 ^{ab}	5,9 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a	8,6 ^{ab}	8,8 ^a	6,3 ^c	7,0 ^{bc}
	F32	2,8 ^b	2,8 ^c	1,7 ^c	2,8 ^a	0,0 ^d	1,8 ^c	4,9 ^{ab}	4,9 ^c	2,8 ^{cd}	5,3 ^{ab}	3,9 ^b	3,6 ^c	6,9 ^c	6,0 ^d	7,1 ^b	6,5 ^{ab}	6,1 ^{ab}	5,9 ^b	8,9 ^a					

F37	2,1 ^{bc}	1,4 ^{de}	1,3 ^{cd}	1,2 ^{bc}	1,7 ^b	1,3 ^{cd}	4,9 ^{ab}	3,0 ^{de}	2,7 ^{cd}	5,4 ^{ab}	2,8 ^c	4,1 ^{bc}	8,4 ^{ab}	8,1 ^{ab}	6,4 ^c	6,4 ^{ab}	6,1 ^{ab}	6,3 ^{ab}	9,0 ^a	9,0 ^a	7,3 ^c	9,0 ^a	9,0 ^a	6,8 ^c
F38	1,9 ^c	1,6 ^d	0,9 ^{de}	0,0 ^e	1,1 ^{bc}	2,9 ^{ab}	4,4 ^{bc}	2,5 ^e	2,1 ^d	4,6 ^b	2,8 ^c	3,7 ^c	7,2 ^{bc}	5,9 ^d	5,4 ^{cd}	5,8 ^b	4,9 ^b	6,2 ^{ab}	9,0 ^a	8,8 ^a	5,9 ^{de}	9,0 ^a	5,1 ^d	8,7 ^a
F39	1,3 ^{cd}	1,2 ^{de}	1,3 ^{cd}	1,4 ^b	0,3 ^{cd}	1,3 ^{cd}	4,3 ^{bc}	2,0 ^{ef}	1,4 ^e	3,9 ^{bc}	1,3 ^f	2,6 ^e	7,4 ^{bc}	7,3 ^{bc}	6,1 ^c	6,1 ^{ab}	5,7 ^{ab}	6,0 ^b	9,0 ^a	7,7 ^c	7,0 ^c	7,9 ^b	9,0 ^a	8,0 ^{ab}
F40	2,1 ^{bc}	2,8 ^c	1,3 ^{cd}	0,0 ^e	0,9 ^{cd}	3,3 ^a	5,7 ^a	6,1 ^a	1,4 ^e	3,5 ^c	2,9 ^c	4,2 ^b	8,6 ^{ab}	8,3 ^a	4,3 ^e	5,8 ^b	6,1 ^{ab}	7,3 ^a	8,9 ^a	9,0 ^a	8,4 ^{ab}	8,9 ^a	8,2 ^b	9,0 ^a
F41	1,7 ^c	1,2 ^{de}	1,3 ^{cd}	0,9 ^d	1,6 ^b	0,5 ^{de}	4,7 ^b	2,4 ^e	2,2 ^d	4,7 ^b	2,1 ^{cd}	3,4 ^{cd}	8,1 ^{ab}	7,8 ^b	6,1 ^c	6,3 ^{ab}	6,0 ^{ab}	6,4 ^{ab}	9,0 ^a	8,2 ^b	9,0 ^a	8,6 ^a	9,0 ^a	8,2 ^{ab}
F42	2,1 ^{bc}	1,4 ^{de}	1,0 ^{cd}	1,2 ^{bc}	1,2 ^{bc}	1,0 ^{cd}	4,6 ^b	1,8 ^f	2,7 ^{cd}	5,1 ^{ab}	3,1 ^{bc}	4,1 ^{bc}	7,8 ^b	7,1 ^{bc}	5,0 ^d	5,8 ^b	5,7 ^{ab}	6,5 ^{ab}	9,0 ^a	8,3 ^b	8,7 ^{ab}	8,5 ^{ab}	7,7 ^{bc}	8,9 ^a
F43	2,1 ^{bc}	1,7 ^d	1,3 ^{cd}	1,1 ^{bc}	1,0 ^{bc}	2,3 ^b	4,7 ^b	4,4 ^c	2,5 ^{cd}	5,5 ^{ab}	2,9 ^c	4,2 ^b	7,7 ^b	6,4 ^{cd}	7,1 ^b	6,6 ^a	6,2 ^{ab}	6,1 ^{ab}	9,0 ^a	8,0 ^b	9,0 ^a	9,0 ^a	6,2 ^c	7,4 ^b
Médias***	2,1 ^A	1,6 ^B	1,2 ^{BC}	1,1 ^C	1,3 ^{BC}	1,5 ^B	4,6 ^A	3,8 ^{AB}	2,7 ^C	4,4 ^A	3,0 ^B	4,1 ^{AB}	7,5 ^A	6,6 ^{AB}	6,1 ^B	6,1 ^B	5,6 ^C	6,0 ^B	8,9 ^A	8,4 ^{AB}	7,7 ^B	8,4 ^{AB}	7,9 ^B	7,5 ^{BC}

*Meio INPA acrescido de 0,2 mL de: Nafta (N); Gasolina (G); Querosene (Q); Óleo diesel (D); Óleo lubrificante (L).

**Sigla de identificação dos isolados depositados na coleção do LEBMAM.

***Médias dos meios nos diferentes horários.

Obs.: Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %; minúsculas nas colunas para comparar os valores dentro de cada tratamento e maiúsculas na linha para comparar os meios com fontes de carbono diferentes.

Fonte: Autores.

A toxicidade dos hidrocarbonetos varia para cada espécie de microrganismo, no entanto, o tamanho das moléculas e a volatilidade desses derivados de petróleo podem estar diretamente relacionados as características pertinentes ao crescimento micelial dos fungos, afetando em uma maior abundância de hifas, tendo em vista que quanto mais permeáveis e voláteis podem mais facilmente comprimem as células uma vez que penetrem em sua superfície.

SEABRA (1997) propõe que os alcanos na faixa de C5 a C9 (cinco a nove carbonos), como nafta e gasolina, devido aos seus efeitos como solventes, têm facilidade para romper a estrutura da membrana lipídica, tornando-se tóxicos a vários microrganismos, enquanto os alcanos de C10 a C22 (querosene, óleo diesel e óleo lubrificante), são mais facilmente metabolizados. Entretanto, SINGH (2006) propõe que fungos filamentosos não apresentam uma exclusividade de degradação em relação ao tamanho da cadeia carbônica; sendo, de acordo com ARUN e EYINI (2011), reconhecidos também pelo potencial em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no petróleo, exibindo diferentes capacidades de metabolização desses hidrocarbonetos, quando comparados a bactérias e leveduras.

OTSUKA (2015), ao avaliar a biodegradação de tolueno por 50 fungos filamentosos isolados de ambientes contaminados com petróleo, observou que todas as cepas demonstraram tolerância à toxicidade da molécula de tolueno, sendo *Trichoderrma koningii* um dos fungos que apresentou alta tolerância ao composto com o maior crescimento e maior halo (6,0 cm). Menores crescimentos miceliais foram obtidos por ZANCAN *et al.* (2012), ao examinarem *S. sclerotiorum* na presença de diferentes fungicidas e *Trichoderrma harzianum*. De igual modo, LIMA *et al.* (2006) ao estudarem fungos filamentosos, obtiveram as maiores velocidades de crescimento para os isolados dos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* na degradação de óleo diesel, gasolina e óleo de soja.

O estudo da capacidade de microrganismos aeróbios e anaeróbios crescerem na presença de hidrocarbonetos de petróleo, utilizados como fonte de carbono é descrita por vários autores (CÁUPER *et al.*, 2021; MENEZES *et al.*, 2019; CÁUPER, 2018; CRUZ e MARSAIOLI, 2012; SAVAGE *et al.*, 2010; HOREL e SCHIEWER, 2009), os quais também destacam como fatores primordiais para realização dessa atividade o uso de nutrientes adequados e a presença de aceptores de elétrons para manter ativos esses microrganismos.

O meio de cultura INPA utilizado neste estudo possui os nutrientes, Se^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} considerados como cofatores enzimáticos fundamentais para a atividade catalítica de inúmeras enzimas (CALLERA, 2017; ADALBERTO, 2005). E os tampões fosfatos (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) que proporcionam uma maior estabilidade de pH para o meio, impedindo grandes oscilações de pH, bem como auxiliam na produção de ATP para realização de diversas funções metabólicas (DEANGELIS, 2022). Desse modo, os nutrientes presentes no meio de

cultura INPA, podem ter influenciado no desempenho de funções celulares relacionadas ao metabolismo de hidrocarbonetos derivados de petróleo (JACQUES *et al.*, 2007), acelerando as taxas de reação enzimática pela promoção de um estado ativo das enzimas envolvidas no processo de crescimento.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DERIVADOS, UTILIZANDO O INDICADOR REDOX – DCPIP

As Tabelas 3 a 7 apresentam as porcentagens de descoloração do DCPIP observadas nos meios com diferentes fontes de carbono, obtidas a partir dos valores de concentração do indicador DCPIP (APÊNDICES B a F). Devido ao rápido crescimento dos fungos, a leitura foi realizada no período de cinco dias, em intervalos de 24h, onde foi observada a redução do DCPIP. Para efeito ilustrativo, a Figura 9 mostra o teste com a coloração total e descoloração do indicador DCPIP.

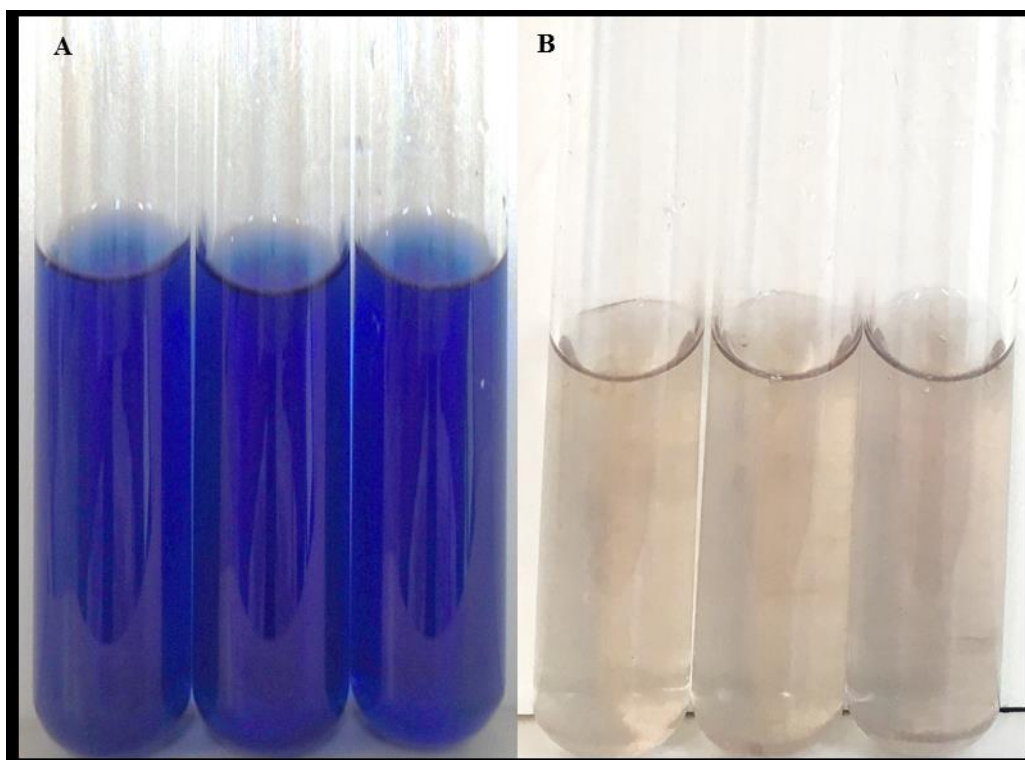


Figura 9. Demonstração da avaliação do potencial de degradação, utilizando o indicador DCPIP, onde A: controle sem descoloração do indicador; B: isolado INPA F14 após 72 horas de incubação, em gasolina.

Fonte: Autoria própria.

Em nafta como fonte de carbono, os tratamentos apresentaram descoloração somente às 24 horas de incubação. Os fungos INPA F28 e INPA F43 apresentaram as maiores porcentagens de descoloração, 33,21% e 33,57%, respectivamente, após 24h. E após 72h, os fungos INPA

F08, INPA F25, INPA F29, INPA F38 e INPA F41 apresentaram seus picos de descoloração com 30,23% a 34,88%. Por outro lado, os fungos com as menores porcentagens de descoloração ao longo de 120h foram INPA F01, INPA F16 e INPA F19, variando entre 0 e 11,54% (Tabela 3). Nesta fonte de carbono, foram selecionados cinco fungos que apresentaram resultados positivos: INPA F08, F25, F29, F33 e F43.

Tabela 3. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de nafta, em relação ao controle sem inóculo.

Tratamentos	% de descoloração de DCPIP (mg.L ⁻¹)					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	0	0	0	0	0	0
INPA F01	0	2,17	11,19	0	0	11,54
INPA F02	0	8,66	1,87	10,08	5,06	17,69
INPA F03	0	12,27	19,03	0	2,33	8,46
INPA F04	0	26,35	4,85	16,67	14,40	2,31
INPA F05	0	11,55	14,55	5,81	0	5,38
INPA F06	0	3,97	13,81	15,89	15,56	10,77
INPA F07	0	0,36	13,06	17,44	0	6,92
INPA F08	0	19,13	12,69	31,40	28,02	28,46
INPA F09	0	9,39	24,25	8,91	8,95	0
INPA F10	0	6,14	8,21	22,48	11,28	0
INPA F11	0	11,19	11,19	13,95	0	0
INPA F12	0	18,41	0,75	28,29	18,29	33,46
INPA F13	0	16,61	18,28	11,63	0	0
INPA F14	0	7,58	12,69	23,64	5,06	15,00
INPA F15	0	8,66	8,58	15,89	18,29	24,23
INPA F16	0	8,66	7,09	0	0	0
INPA F17	0	15,52	15,67	24,03	21,40	7,69
INPA F18	0	16,61	13,06	10,85	0	3,46
INPA F19	0	6,86	5,97	6,98	0	5,77
INPA F20	0	16,61	13,81	23,26	12,45	29,23
INPA F21	0	1,81	16,04	22,48	24,12	26,15
INPA F22	0	4,69	8,58	18,22	0	16,54
INPA F23	0	29,24	25,75	23,26	21,79	6,92
INPA F24	0	26,71	25,75	5,04	0	4,23
INPA F25	0	15,52	13,81	34,11	30,35	24,62
INPA F26	0	23,47	23,51	17,83	0	0
INPA F27	0	29,96	25,00	26,74	20,62	0
INPA F28	0	33,21	13,43	17,83	0	0
INPA F29	0	16,61	15,67	30,23	28,02	15,77
INPA F30	0	23,47	15,67	15,89	0	6,15
INPA F31	0	20,94	26,12	20,16	19,84	12,31
INPA F32	0	7,22	11,19	20,93	23,35	15,77
INPA F33	0	11,19	23,88	28,29	33,07	24,62
INPA F34	0	24,55	24,63	12,79	1,95	19,62
INPA F35	0	24,91	20,52	28,29	27,24	3,46
INPA F36	0	5,42	22,39	20,54	26,85	19,23
INPA F37	0	17,69	11,19	27,91	7,39	13,08
INPA F38	0	18,41	4,85	32,56	19,07	23,46
INPA F39	0	24,91	23,88	6,20	0	0,00
INPA F40	0	7,94	6,34	16,67	12,45	12,69
INPA F41	0	3,97	0,75	34,88	29,18	0
INPA F42	0	0	23,51	8,14	0	8,46
INPA F43	0	33,57	29,48	23,26	22,96	26,54

Fonte: Autoria própria.

Na gasolina como fonte de carbono (Tabela 4), foram selecionados oito tratamentos com as melhores velocidades, porcentagens de descoloração (até 48 horas) e estabilidade na atividade de degradação. Após a incubação (0h), os fungos INPA F20, F21, F23, F25, F26, F28, F30, F31, F33, F34, F35, F36, F41 e F42 apresentaram descoloração quase que imediata, igual ou superior a 25%, sendo INPA F30 e F42, os que apresentaram maior porcentagem de descoloração nesse período, 32,86% e 32,51%, respectivamente. Após 24h, os fungos INPA F29, F31, F35, F36, F39, F41 e F43 apresentaram as maiores descolorações de 34,44% a 36,42%. E após 48 horas, os fungos INPA F25, F29, F33, F37, F38, F39, F42 e F42 com 31,09% a 38,20%. Os fungos INPA F1, F11, F15, F16 e F19 apresentaram as menores porcentagens de descoloração, durante as 120h de avaliação (0% a 11,59%).

Tabela 4. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de gasolina, em relação ao controle sem inóculo.

Tratamentos	% de descoloração de DCPIP (mg.L ⁻¹)					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	0	0	0	0	0	0
INPA F01	0	9,60	8,99	3,03	4,71	0
INPA F02	4,59	17,88	13,11	20,08	10,98	20,23
INPA F03	21,20	5,30	23,22	0	0	4,58
INPA F04	16,61	0	3,75	19,32	26,67	29,01
INPA F05	23,67	6,62	19,10	0	-3,53	0,38
INPA F06	20,14	16,23	16,85	19,32	10,59	17,18
INPA F07	16,96	14,90	5,99	19,70	14,90	22,14
INPA F08	11,31	14,90	3,75	32,20	27,45	28,24
INPA F09	23,32	15,89	18,35	0	0	0
INPA F10	24,38	18,21	13,48	15,91	2,75	9,54
INPA F11	0	7,62	5,62	0	10,59	0
INPA F12	9,19	16,89	11,61	17,80	0	25,95
INPA F13	10,95	7,28	21,35	0	0	0
INPA F14	22,97	16,89	25,47	26,89	5,49	12,60
INPA F15	0	0,00	7,87	0	5,88	0
INPA F16	1,77	11,59	3,75	0	0	0
INPA F17	9,19	21,85	21,35	23,11	5,49	32,82
INPA F18	2,12	8,94	21,35	0	4,71	8,02
INPA F19	0	6,29	11,61	0,76	1,57	0
INPA F20	30,04	16,89	3,75	20,08	13,33	31,68
INPA F21	27,56	30,13	31,84	24,62	21,57	26,72
INPA F22	24,03	20,86	17,23	12,12	4,31	17,18
INPA F23	30,04	32,12	26,97	21,21	21,96	7,63
INPA F24	23,56	27,15	25,09	7,20	0	4,96
INPA F25	27,56	21,85	36,33	29,92	23,53	25,19
INPA F26	28,98	30,79	16,48	15,15	0,39	0
INPA F27	21,55	31,79	26,22	14,77	20,39	0
INPA F28	25,44	32,12	25,84	17,80	13,73	0
INPA F29	16,61	34,44	34,08	27,27	18,43	16,41
INPA F30	32,86	31,79	16,48	11,36	11,37	6,87
INPA F31	29,68	34,77	26,22	12,88	12,94	12,98
INPA F32	22,61	27,81	19,85	5,68	16,47	16,41
INPA F33	27,56	32,12	38,20	24,62	22,75	25,19
INPA F34	31,80	30,79	23,97	15,53	0	20,23
INPA F35	25,80	36,42	25,47	19,70	16,08	4,20
INPA F36	25,44	35,10	26,97	25,38	21,57	19,85
INPA F37	22,61	33,11	31,46	13,26	15,29	13,74
INPA F38	16,61	32,12	32,21	23,48	4,31	24,05
INPA F39	24,03	35,10	31,46	23,86	0	0,76

INPA F40	22,61	27,81	21,72	7,58	7,84	13,36
INPA F41	27,56	34,44	35,96	21,97	18,82	0
INPA F42	32,51	32,45	31,09	19,70	23,92	9,16
INPA F43	18,37	36,09	18,73	15,53	19,22	6,11

Fonte: Autoria própria.

Ao se usar o querosene (Tabela 5), os melhores tratamentos foram com os fungos INPA F08, F12, F17, F20, F23, F25, F28, F29, F30, F31, F35, F36, F38 e F41. Destes, no início da incubação com exceção do INPA F08, todos os demais apresentaram descoloração variando entre 17,65 e 34,26%, sendo o INPA F30 o que apresentou a maior descoloração em 0h, estabilizando entre 17,86% e 25,76% nos horários seguintes. Com 24h, INPA F17, INPA F23, INPA F28 e INPA F35, apresentaram os picos de descoloração de 30,14% a 34,75%. E após 72h de incubação, o INPA F25, INPA F33, INPA F38 e o INPA F41 apresentaram as maiores descolorações entre os tratamentos com 40,97 a 41,67%, seguidos por INPA F08, F12, F29, F31, F35 e F36 com porcentagens variando entre 32,64% a 38,89%. As menores descolorações apresentadas durante os períodos avaliados foram dos fungos INPA F01, INPA F16, INPA F19 e INPA F42 (0% a 18,69%).

Tabela 5. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de querosene, em relação ao controle sem inóculo.

Tratamentos	% de descoloração de DCPIP (mg.L ⁻¹)					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	0	0	0	0	0	0
INPA F01	0	11,70	11,19	0	7,94	0
INPA F02	25,26	0	11,19	2,43	0	15,91
INPA F03	31,83	21,63	25,00	16,67	0,00	31,44
INPA F04	28,03	25,18	13,06	31,94	25,00	31,06
INPA F05	31,49	23,40	22,39	12,50	1,59	20,83
INPA F06	22,49	0,00	14,93	6,60	0	7,20
INPA F07	23,53	13,48	14,93	10,76	19,05	10,98
INPA F08	0	26,24	26,49	37,15	22,62	20,45
INPA F09	31,83	25,18	26,87	12,15	0	32,95
INPA F10	22,15	1,06	16,04	22,92	0	0
INPA F11	3,81	9,22	10,82	5,90	10,71	10,23
INPA F12	26,99	26,24	21,27	32,64	24,21	28,03
INPA F13	31,49	18,44	20,90	18,06	8,73	23,48
INPA F14	23,53	21,99	13,06	12,50	0	0,38
INPA F15	1,73	8,16	12,69	21,18	16,27	10,61
INPA F16	0,35	17,73	8,96	0	0	0
INPA F17	28,03	30,14	21,27	28,82	17,06	24,24
INPA F18	32,53	25,18	27,99	19,44	7,54	27,65
INPA F19	0	4,96	13,81	0,69	0	0
INPA F20	17,65	26,60	22,39	26,39	23,02	31,82
INPA F21	29,41	28,01	9,70	22,57	19,44	24,24
INPA F22	30,10	27,66	3,73	17,01	15,08	13,26
INPA F23	29,07	32,62	25,75	31,25	23,02	17,05
INPA F24	34,60	8,87	23,88	27,78	12,70	29,92
INPA F25	31,83	30,14	21,27	41,67	25,79	32,95
INPA F26	33,91	6,03	19,78	26,04	11,11	24,24
INPA F27	28,03	28,72	22,39	26,04	23,81	8,33

INPA F28	28,37	33,69	21,64	25,00	23,02	22,35
INPA F29	26,99	17,38	22,76	38,89	25,00	22,73
INPA F30	34,26	21,99	25,00	25,00	17,86	25,76
INPA F31	27,68	33,69	29,10	37,15	26,19	25,76
INPA F32	30,45	32,27	10,45	21,53	23,81	28,79
INPA F33	21,80	25,18	13,06	40,97	27,78	27,27
INPA F34	35,29	14,54	22,76	26,39	8,33	29,55
INPA F35	29,76	34,75	26,49	35,07	28,57	18,18
INPA F36	28,37	30,50	27,91	33,68	23,81	13,64
INPA F37	30,45	31,21	6,34	27,78	28,17	21,59
INPA F38	31,83	27,38	26,49	41,67	26,59	32,58
INPA F39	33,56	10,99	27,61	31,60	12,30	31,44
INPA F40	30,45	29,43	8,58	21,53	0	8,71
INPA F41	26,99	25,18	23,06	41,67	29,76	27,27
INPA F42	18,69	0	7,84	0,00	0	0
INPA F43	12,11	26,24	6,34	15,97	19,05	16,67

Fonte: Autoria própria.

Com óleo diesel como fonte de carbono, os melhores tratamentos foram com os fungos INPA F26, F29, F31, F33, F34, F35, F36, F37, F38, F39 e F41. Ainda às 0h de incubação, todos os fungos selecionados mostraram descoloração de 24,46% a 32,01%. Após 24h, os fungos INPA F31 e INPA F35 apresentaram descolorações de 33,68% e 38,54%, as maiores nesse horário, seguidos por INPA F29 e INPA F33 com 32,99% e 33,33% de descoloração, respectivamente. Após 48 h, INPA F26, INPA F34, INPA F36 e INPA F39 mostraram descolorações variando entre 30,58% e 35,61%, enquanto que os INPA F33 e INPA F38 se destacaram com 37,05% e 39,57% de descoloração, após 72h. E em 96h, os fungos INPA F29 e INPA F37 apresentaram porcentagens de 34,05% e 36,92%, respectivamente. Os tratamentos com as menores descolorações foram INPA F01, INPA F11, INPA F14 e INPA F15, variando de 0% a 15,83%, durante as 120h de incubação (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de óleo diesel, em relação ao controle sem inóculo.

Tratamentos	% de descoloração de DCPIP (mg.L ⁻¹)					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	0	0	0	0	0	0
INPA F01	2,52	13,89	11,87	11,51	0	8,73
INPA F02	8,27	6,25	11,15	7,91	13,98	24,73
INPA F03	29,50	31,25	23,02	14,75	13,26	37,09
INPA F04	27,34	19,79	16,91	34,53	36,92	24,73
INPA F05	28,42	26,04	8,27	11,51	8,60	10,18
INPA F06	10,79	14,24	11,51	17,27	12,54	23,27
INPA F07	11,51	12,85	8,99	14,03	27,24	11,27
INPA F08	20,14	25,00	2,52	35,25	37,99	9,82
INPA F09	28,42	29,17	25,90	13,67	15,77	29,09
INPA F10	11,51	5,90	0	16,91	18,28	22,55
INPA F11	0	10,42	10,79	8,27	17,56	0,73
INPA F12	16,91	25,00	16,91	27,34	38,71	20,36
INPA F13	29,50	25,35	14,75	16,91	18,28	32,36
INPA F14	9,71	2,43	0	15,83	7,17	8,36
INPA F15	13,31	14,58	10,43	8,63	0	0

INPA F16	16,91	7,99	5,40	9,71	15,05	15,27
INPA F17	22,30	22,92	5,04	33,09	30,47	22,18
INPA F18	30,58	27,43	20,86	16,55	4,30	33,82
INPA F19	0	5,90	16,91	12,59	16,13	2,55
INPA F20	24,46	19,79	21,22	29,14	21,15	16,73
INPA F21	28,06	22,92	29,50	27,70	27,60	26,18
INPA F22	27,34	16,67	21,22	27,34	17,20	0
INPA F23	27,34	32,64	25,18	20,50	13,62	8,73
INPA F24	27,34	27,08	27,70	11,87	15,05	6,91
INPA F25	32,01	32,99	16,91	18,13	37,63	23,64
INPA F26	28,42	25,00	32,01	13,31	13,98	19,64
INPA F27	27,70	30,90	26,26	20,50	16,13	0
INPA F28	21,22	35,76	9,71	10,43	28,32	19,27
INPA F29	29,50	32,99	19,78	31,29	34,05	30,18
INPA F30	28,42	27,43	23,02	23,02	24,37	11,27
INPA F31	25,54	33,68	24,82	32,01	31,18	13,82
INPA F32	25,90	28,13	22,30	31,65	9,32	0
INPA F33	30,58	33,33	23,74	39,57	37,99	32,73
INPA F34	28,78	25,35	31,65	24,10	12,54	14,18
INPA F35	27,34	38,54	23,74	31,29	27,24	0
INPA F36	27,70	26,39	30,58	25,18	26,88	21,82
INPA F37	29,86	20,49	30,58	29,14	36,92	29,82
INPA F38	24,46	25,69	24,10	37,05	36,92	32,00
INPA F39	30,22	28,47	35,61	16,91	30,11	23,27
INPA F40	27,70	28,82	20,14	21,22	22,22	20,36
INPA F41	32,01	25,00	30,58	38,13	35,84	34,91
INPA F42	16,91	28,13	25,54	24,10	11,11	22,55
INPA F43	9,71	39,93	11,15	12,23	30,11	0,73

Fonte: Autoria própria.

Ao utilizar o óleo lubrificante como fonte de carbono, seis fungos foram selecionados levando em consideração os critérios percentuais de descoloração, velocidade e estabilidade da atividade (INPA F04, F25, F33, F35, F38 e F41). No início da incubação, todos os tratamentos selecionados apresentaram descoloração do DCPIP, entre 10,53% a 23,25%. Com o passar do tempo, pôde-se notar uma adaptação rápida a essa fonte de carbono. E após 72h, todos os tratamentos apresentaram seu ápice de descoloração (31,29% a 39,57%), sendo o INPA F33 o melhor com 39,57% de descoloração, seguido pelo INPA F25, INPA38 e INPA F41, com porcentagens variando entre 37,05% e 38,13%. As menores porcentagens de descoloração foram apresentadas pelos fungos INPA F01, F02, F11, F15, F16, F42 e F43 em 0 h apresentaram porcentagens entre 0 e 9,21%, apresentando suas maiores descolorações as 24h e 48h, entre 12,32% e 24,12% (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de descoloração em meio INPA acrescido de óleo lubrificante, em relação ao controle sem inóculo.

Tratamentos	% de descoloração de DCPIP (mg.L ⁻¹)					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	0	0	0	0	0	0
INPA F01	0	2,61	12,68	11,51	0	0
INPA F02	9,21	0	15,94	7,91	3,83	10,28
INPA F03	0	29,48	22,46	14,75	0	17,00

INPA F04	17,11	20,15	26,81	34,53	29,89	32,81
INPA F05	14,47	24,63	18,48	11,51	0	13,44
INPA F06	0,00	0,37	23,91	17,27	8,05	17,39
INPA F07	6,58	4,85	10,14	14,03	5,36	21,74
INPA F08	14,04	20,15	29,71	35,25	21,07	0
INPA F09	14,91	24,25	18,84	13,67	0	15,02
INPA F10	4,39	10,45	15,22	16,91	13,41	22,92
INPA F11	0	6,72	18,12	8,27	2,68	7,91
INPA F12	7,89	16,79	31,52	27,34	22,61	0
INPA F13	14,47	20,90	20,29	16,91	2,68	9,49
INPA F14	4,82	12,69	19,93	15,83	0	19,37
INPA F15	0	11,19	12,32	8,63	0	0
INPA F16	0	13,06	19,20	9,71	11,49	0
INPA F17	17,11	21,64	28,99	33,09	0	11,86
INPA F18	13,60	25,37	21,74	16,55	1,53	18,58
INPA F19	0	10,82	6,16	12,59	14,18	19,76
INPA F20	14,04	16,79	18,12	29,14	21,46	15,81
INPA F21	12,72	25,00	25,36	27,70	23,37	28,06
INPA F22	13,16	26,87	24,28	27,34	15,71	0
INPA F23	14,04	30,97	16,30	20,50	25,29	22,92
INPA F24	18,42	26,87	18,48	11,87	31,42	14,62
INPA F25	14,91	30,97	36,23	38,13	24,52	30,04
INPA F26	17,54	25,00	22,10	13,31	14,56	7,11
INPA F27	12,72	26,87	22,10	20,50	27,97	7,51
INPA F28	8,77	30,60	11,23	10,43	20,31	22,53
INPA F29	0	29,85	33,70	31,29	16,48	17,79
INPA F30	17,98	20,90	28,62	23,02	19,54	5,53
INPA F31	7,46	31,34	9,06	32,01	24,90	0
INPA F32	13,16	26,87	20,29	31,65	18,01	0
INPA F33	23,25	31,72	31,88	39,57	35,25	30,04
INPA F34	18,42	27,61	22,10	24,10	16,48	21,34
INPA F35	12,28	27,61	13,04	31,29	30,65	20,16
INPA F36	10,96	25,37	31,52	25,18	3,45	7,11
INPA F37	14,04	29,48	22,46	29,14	29,12	11,46
INPA F38	20,61	31,72	28,99	37,05	33,72	31,23
INPA F39	19,74	28,73	31,52	16,91	24,14	15,81
INPA F40	11,84	26,49	22,10	21,22	9,96	0
INPA F41	10,53	26,87	24,64	38,13	24,90	30,43
INPA F42	0	18,28	0	10,79	0	0
INPA F43	0	24,12	2,06	0,00	24,38	0

Fonte: Autoria própria.

A capacidade de fungos *Trichoderma* em degradar hidrocarbonetos de petróleo foi avaliada utilizando o indicador redox diclorofenol indofenol (DCPIP), capaz de alterar da cor azul (oxidado) para incolor (reduzido) (BIDOIA *et al.*, 2010). A alteração dessa coloração deve-se a transformação da estrutura da molécula DCPIP. E por ser um método simples, de rápida análise e baixo custo vem sendo utilizado para triagem de microrganismos, atuando como indicador de enzimas intracelulares, que catalisam reações de oxirredução de hidrocarbonetos de petróleo. CRUZ *et al.* (2014) sugerem que por ser um indicador reversível, após a oxidação parcial ou total do DCPIP, o meio volta a ficar azul.

Além disso, o uso de nutrientes e aceptores de elétrons como os presentes no meio INPA podem influenciar diretamente na atividade de degradação, exibindo efeitos positivos na

biodegradação. LEE *et al.* (2011), ao avaliarem a eficiência de microrganismos degradadores concluíram que a adição de nutrientes é necessária para o aumento do crescimento microbiano e a atividade degradadora.

Com os resultados obtidos podemos inferir que cada fungo demonstrou diferente comportamento na modificação da intensidade da cor do indicador redox em função da fonte de carbono e do tempo, o que pode indicar capacidades diferentes de degradação entre as cepas estudadas. Em diversos trabalhos foi constatado que os diferentes compostos de hidrocarbonetos nem sempre são degradados em igual proporção pelo mesmo microrganismo, defendendo assim, a ideia de que cada espécie é responsável por degradar um tipo de componente do óleo fazendo-se necessário o uso de consórcios para melhorar a eficiência da biorremediação (WEBER e SANTOS, 2013).

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram observados por OLIVEIRA *et al.* (2022), ao avaliar a biodegradação de óleo lubrificante por *Pseudomonas aeruginosa* por 120h, que alcançou uma porcentagem de degradação de 36,70%. AZEVEDO (2010), estudando fungos isolados de manguezal, verificou que a mudança da cor do indicador DCPIP ocorreu em diferentes tempos, variando de 10h às 68h, sendo que os fungos *Trichoderma* apresentaram descoloração total do indicador em aproximadamente 50h, indicando a capacidade de degradar o substrato. Em outro estudo, PESÁNTEZ e CASTRO (2016) verificaram que a inoculação de cepas de *Trichoderma* em solos contaminados por hidrocarbonetos reduziu em até 47% a concentração total destes compostos.

MARIANO *et al.* (2008), na realização de experimentos *in situ*, observaram que os melhores resultados de degradação foram obtidos com uso de consórcios microbianos. Contudo, para que esses consórcios sejam utilizados torna-se necessário o conhecimento da capacidade degradativa individual dos isolados para que ocorra um sinergismo na degradação, quando forem utilizados.

Desta maneira, foram selecionados dez fungos que apresentaram porcentagens de descoloração igual ou superior a 30% e estabilidade na degradação, durante as 120h de avaliação, em todas as cinco fontes de carbono avaliadas: INPA F08, INPA F23, INPA F25, INPA F29, INPA F31, INPA F33, INPA F35, INPA F38, INPA F36 e INPA F41.

4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A Tabela 8 apresenta a atividade emulsificante A/O adquirida durante o período de avaliação de produção de biossurfactantes para as 10 isolados de *Trichoderma*, nos meios de

cultura INPA e BH. Para efeito ilustrativo, a Figura 10 mostra o teste com atividade emulsificante nos meios minerais INPA e BH em 48h de incubação.

No meio mineral INPA às 24h de incubação a maior produção foi observada para o extrato INPA F29 com 3,09 UE, os demais tratamentos apresentaram AE (A/O) de 0,67 a 1,93 UE. Com 48 h, houve aumento na atividade emulsificante A/O em todos os extratos analisados, sendo o extrato INPA F23 o de maior destaque com 5,45 UE e o extrato INPA F25 o de menor AE, com 2,90 UE. Por outro lado, no meio BH, em 24h a maior AE em A/O foi do extrato INPA F08 com 3,80 UE e as menores produções foram para INPA F31 e INPA F36 com 1,56 e 1,24 UE, respectivamente. Em 48 h de incubação, apenas quatro extratos exibiram aumento na produção de emulsificante água em óleo, sendo eles: INPA F23, INPA F25, INPA F31 e INPA F36, com médias que variaram de 1,81 a 2,53 UE.

Com relação a produtividade de emulsificantes, os extratos do meio INPA foram os que alcançaram maiores médias, de 0,62 UE/d (INPA F29) a 1,89 UE/d (INPA F23) após 48 h de incubação, enquanto para os extratos do meio BH a cepa INPA F36 obteve a maior produtividade com 0,62 UE/d.

Tabela 8. Atividade emulsificante água em óleo (CE), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.

Atividade emulsificante água em óleo												
Extratos	INPA						BH					
	A/O (UE)				Produtividade (UE/d)	A/O (UE)				Produtividade (UE/d)		
	24 h		48 h			24 h		48 h				
Controle	0	c	0,01	c	0	d	0	c	0,03	c	0,01	c
INPA F08	1,02	bc	3,15	ab	1,07	b	3,80	a	2,91	a	0	c
INPA F23	1,67	abc	5,45	a	1,89	a	2,17	a	2,30	a	0,06	c
INPA F25	0,67	bc	2,90	ab	1,12	b	2,26	a	2,53	a	0,14	b
INPA F29	3,09	a	4,32	a	0,62	c	2,86	a	1,44	ab	0,00	c
INPA F31	1,27	bc	4,26	a	1,50	ab	1,56	ab	1,81	ab	0,13	b
INPA F33	1,62	abc	4,54	a	1,46	ab	3,16	a	2,34	a	0	c
INPA F35	1,76	ab	4,55	a	1,40	ab	3,13	a	2,43	a	0	c
INPA F36	1,93	ab	3,37	ab	0,72	c	1,24	ab	2,47	a	0,62	a
INPA F38	1,01	bc	3,24	ab	1,12	b	3,30	a	2,68	a	0	c
INPA F41	1,02	bc	4,22	ab	1,60	ab	3,03	a	1,80	ab	0	c
Médias	1,37	Y	3,64	X			2,41	X	2,08	Y		

Obs.: Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %; minúsculas nas colunas para comparar os valores dentro de cada tratamento e maiúsculas na linha para comparar os meios.

Fonte: Autoria própria.

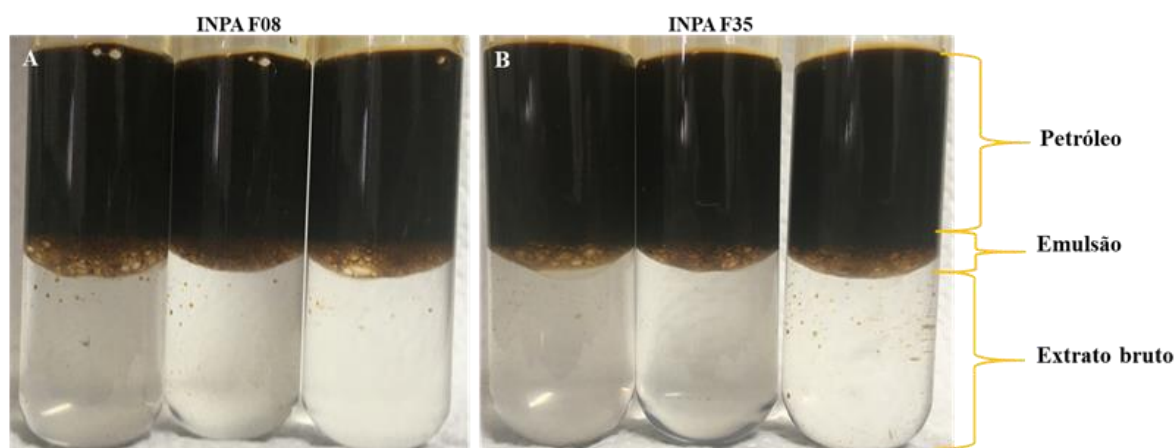


Figura 10. Atividade emulsificante nos meios minerais INPA (A) e BH (B) em dois dias de incubação.
Fonte: Autoria própria.

Quanto ao índice de emulsificação exposto na Figura 11, no meio mineral INPA as emulsões se mantiveram estáveis para todas os extratos; às 24h de incubação o maior IE% foi alcançado por INPA F29 (IE = 13,77) e o menor por INPA F25 (IE = 3,01); após 48h, os extratos INPA F28 (IE = 28,37) e INPA F33 (IE = 27,96) foram os que apresentaram maiores índices. Por outro lado, no meio mineral BH, apenas cinco tratamentos apresentaram estabilidade durante o período de incubação (INPA F23, INPA F25, INPA F31, INPA F36 e INPA F38), sendo em 24h o maior índice obtido por INPA F08 (IE = 18,38) e às 48h pela cepa INPA F38 (IE = 16,54).

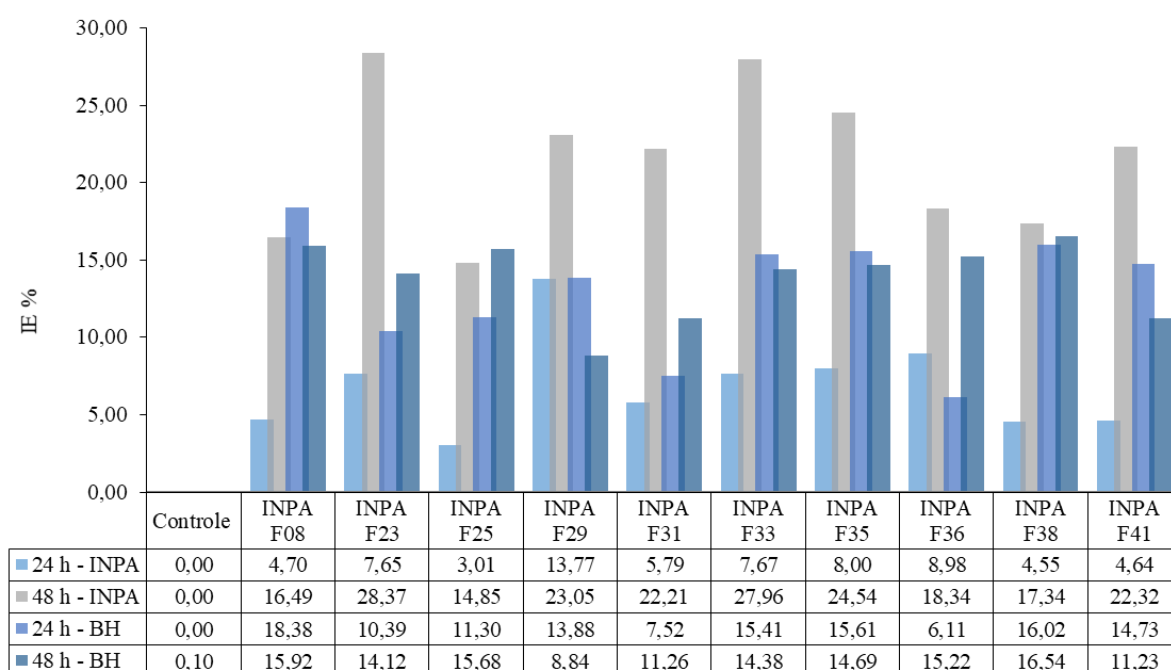


Figura 11. Índice de Emulsificação (IE) das cepas de *Trichoderma* spp. na presença de petróleo em meios minerais INPA e BH, às 24 e 48h.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados na Tabela 9, demonstram que não houve quantidades elevadas de emulsificantes óleo em água (O/A), às 48h de avaliação. Nos extratos em meio INPA acrescidos de petróleo, os valores obtidos variaram de 0,26 UE a 0,40 UE, sendo o INPA F35 o de maior atividade O/A. No meio BH, os extratos INPA F25, INPA F36, INPA F38 e INPA F41 foram os de maior destaque estatisticamente, no entanto neste meio os valores alcançados foram entre 0,12 UE e 0,20 UE.

Do mesmo modo que na produtividade emulsificante água e óleo (A/O), os extratos no meio INPA foram os que obtiveram maiores médias na atividade O/A, de 0,13 UE/d a 0,20 UE/d e; no meio BH a maior produtividade foi de 0,10 UE/d com os extratos INPA F25 e INPA F41.

Tabela 9. Atividade emulsificante óleo em água (densidade óptica), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.

Extratos	Atividade emulsificante óleo em água							
	INPA				BH			
	O/A (UE)		Produtividade (UE/d)		O/A (UE)		Produtividade (UE/d)	
Controle	0,10	c	0,05	c	0,06	c	0,03	c
INPA F08	0,26	bc	0,13	ab	0,15	b	0,08	b
INPA F23	0,32	ab	0,16	ab	0,12	b	0,06	ab
INPA F25	0,33	ab	0,17	ab	0,19	ab	0,10	a
INPA F29	0,32	ab	0,16	ab	0,12	b	0,06	ab
INPA F31	0,28	abc	0,14	ab	0,15	b	0,08	b
INPA F33	0,30	abc	0,15	ab	0,14	b	0,07	ab
INPA F35	0,40	a	0,20	a	0,15	b	0,08	b
INPA F36	0,31	abc	0,16	ab	0,18	ab	0,09	ab
INPA F38	0,31	abc	0,16	ab	0,17	ab	0,09	ab
INPA F41	0,37	ab	0,19	a	0,20	ab	0,10	a
Médias	0,30	X			0,15	Y		

Obs.: Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %; minúsculas nas colunas para comparar os valores entre os tratamentos e maiúsculas na linha para comparar os meios.

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar as atividades de emulsificação considerando-se os meios nutritivos, ficou evidente que o meio INPA influenciou em uma maior produção dessas substâncias pelos *Trichoderma*. Essa diferença entre os meios de cultura foi demonstrada estatisticamente ao conferir qual dos dois meios formou camadas mais espessas e estabilidade de emulsificantes do tipo água em óleo de 24h para 48h (Tabela 8) e de óleo em água (Tabela 9).

Os biossurfactantes têm a capacidade de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos, aumentando sua biodisponibilidade para os microrganismos, o que potencializa sua taxa de biodegradação (RAHMAN e GAKPE, 2008). Podendo ser analisados por sua habilidade emulsificante ou pela redução de tensão superficial (YOUSSEF *et al.*, 2004). Para BANAT et

al. (2014), biossurfactantes com alto peso molecular estão associados à produção de emulsões e possuem propriedades que atuam no aumento da recuperação e mobilidade de óleos pesados.

Os resultados obtidos neste estudo, podem ser considerados altos quando comparados com alguns outros presentes na literatura. CAUPER (2018) ao testar a produção de biossurfactantes por *Trichoderma* spp. nos meios de cultura BH e INPA, em 48h alcançou máxima atividade água em óleo de 9,60 e 9,58 UE e índices de emulsificação de 23,42% e 23,94% e, para atividade óleo em água de 0,05 U a 0,08 U em meio BH e de 0,13 a 0,27 U em INPA. Por outro lado, RODRIGUES *et al.* (2010), ao realizar produção de emulsificantes em fermentação em estado sólido, por cepas de *Aspergillus fumigatus*, alcançaram atividade máxima de O/A de 6,1 UE.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, os extratos brutos não apresentaram alterações expressivas nas medidas de pH. Após 24h de incubação, ao utilizar o meio INPA o pH variou entre 5,70 e 6,00 e no meio BH de 7,10 a 7,43. Às 48h a variação de pH no meio INPA manteve-se entre 5,70 e 6,00 e em BH de 7,17 a 7,53.

ADAMS *et al.* (2015), relatam que os fatores ambientais que afetam a biodegradação são pH, temperatura, teor de água, teor de oxigênio, concentração de contaminantes, entre outros. A faixa de pH está diretamente relacionada a tensão superficial desempenhada pelo biossurfactante sobre o contaminante, visto que uma variação de pH significativa ocasionaria precipitação do biossurfactante e a elevação na tensão superficial (BARROS *et al.*, 2008). O pH ideal para remediação microbiana está próximo a neutralidade, 6,5 a 7,5 e o pH ótimo levemente alcalino, ou seja, um pouco maior que 7,0, sendo os fungos mais tolerantes a condições ácidas quando comparados a bactérias (PEDROZO, 2002; BALBA *et al.*, 1998).

Tabela 10. Avaliação de pH nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.

Extratos*	24h		48h	
	INPA	BH	INPA	BH
Controle	5,93 a	6,90 c	5,87 ab	6,90 c
INPA F08	5,70 c	7,13 b	5,70 b	7,20 b
INPA F23	5,77 c	7,33 ab	5,90 ab	7,20 b
INPA F25	6,00 a	7,30 ab	5,73 b	7,43 ab
INPA F29	5,80 b	7,27 ab	6,00 a	7,33 ab
INPA F31	5,90 a	7,37 ab	6,00 a	7,20 b
INPA F33	5,70 c	7,10 b	5,70 b	7,17 b
INPA F35	5,77 c	7,27 ab	5,90 ab	7,20 b
INPA F36	6,00 a	7,30 ab	5,90 ab	7,20 b
INPA F38	5,90 a	7,27 ab	5,90 ab	7,27 b
INPA F41	5,83 b	7,43 a	5,97 ab	7,53 a
Médias	5,85 B	7,24 B	5,87 A	7,24 A

Obs.: Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %; minúsculas nas colunas para comparar os valores dentro de cada tratamento e maiúsculas na linha para comparar os meios.

*pH inicial (0h) fase aquosa: 7,0.

Fonte: Autoria própria.

4.6 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Os resultados demonstram que todas as 10 cepas fúngicas foram capazes de solubilizar e diminuir significativamente o volume de petróleo, respondendo de forma distinta em relação aos diferentes meios de cultura (Tabela 11). Aos 5 dias de incubação, no meio mineral INPA a cepa INPA F38 foi a que demonstrou maior capacidade de redução da mancha de petróleo com 973,05 mL seguido por INPA F41 e INPA F33, com 739,50 mL e 634,67 mL, para os demais isolados houve uma redução menos acentuada, variando de 154,21 a 489,82 mL, com o meio mineral BH, as cepas INPA F31 e INPA F08 foram as de maior redução, com 1.431,93 mL e 1.228,99 mL, o INPA F25 apresentou a menor redução de volume de petróleo com 50,86 mL.

Tratamentos de bioestimulação e bioaugmentação são constantemente usados em ambientes contaminados como estratégias de remediação (BOOPATHY, 2000). As cepas deste estudo mostraram-se produtoras de biossurfactantes, fator importante no processo de degradação de hidrocarbonetos. Estes metabólitos fazem com que o óleo passe a ter uma maior interação com a água e os microrganismos tenham melhor acesso ao contaminante acelerando a degradação desses compostos (PIRÔLLO, 2006).

Tabela 11. Volume degradado do petróleo (redução), nos meios de cultura INPA e BH acrescido de petróleo.

Cepas	INPA		BH	
	mL*			
INPA F08	0489	d	1,229	b
INPA F23	0,154	h	0,412	f
INPA F25	0,331	e	0,051	h
INPA F29	0,477	d	0,121	g
INPA F31	0,297	f	1,432	a
INPA F33	0,634	c	0,614	d
INPA F35	0,189	g	0,604	d
INPA F36	0,329	e	0,117	g
INPA F38	0,973	a	0,762	c
INPA F41	0,739	b	0,467	e
Médias	0,461	B	0,581	A
Controle	0,077		0,064	

Obs.: Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5 %; minúsculas nas colunas para comparar os valores dentro de cada tratamento e maiúsculas na linha para comparar os meios.

*Valor inicial: 5,0 mL.

Fonte: Autoria própria.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, tolerância a hidrocarbonetos derivados de petróleo, avaliação de degradação e produção de biossurfactantes, pode-se dizer que os fungos *Trichoderma* têm potencial para aplicação em biorremediação de petróleo ou seus derivados. Contudo, são necessários testes adicionais, como cromatografia gasosa para identificar quais compostos estão sendo degradados e/ou produzidos, amostra ambiental (de

solos), entre outros para confirmar a possibilidade do uso desses isolados na em remediação de ambientes contaminados.

5 CONCLUSÕES

O isolamento dos fungos foi bem-sucedido, tendo sido isolados 96 fungos das 16 amostras de solos coletadas, divididos em diferentes gêneros;

Destes 96 fungos, 43 foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichoderma*, isolados de 11 amostras de solos;

Houve variações morfológicas no formato de estruturas (fiálides e conídios) mensuradas nos isolados de *Trichoderma*, indicando diferentes espécies;

Os 43 isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram-se tolerantes aos hidrocarbonetos derivados de petróleo presentes no meio, apresentando crescimentos consideráveis, quando submetidos por quatro dias na presença de nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante;

O crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. variou tanto dentro quanto entre as seis fontes de carbono testadas;

Com exceção da menor produção de hifas na presença dos hidrocarbonetos de petróleo, não houve outras alterações nas características morfológicas das colônias;

Com base nos resultados obtidos nos testes utilizando o indicador redox DCPIP, os isolados de *Trichoderma* mostraram capacidade de degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, sinalizada pela descoloração do indicador;

Dos 43 isolados, foram selecionados dez fungos que apresentaram porcentagens de descoloração do DCPIP em todos os derivados testados (nafta, gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante), mostrando a capacidade de degradar todos esses hidrocarbonetos de petróleo;

Todos os fungos do gênero *Trichoderma* foram capazes de produzir biossurfactantes;

A maior produção de biossurfactantes foi obtida no meio mineral INPA utilizando o petróleo como fonte de carbono;

Os dez *Trichoderma* spp. testados atuaram sobre o petróleo bruto fazendo com que este ficasse mais fluído, indicando que parte dele foi degradado;

São necessários estudos complementares, tais como efeito da temperatura e eficiência de degradação de hidrocarbonetos (cromatografia).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBIYI, A. K. Bioremediation of heavy metals in the soil by *pseudomonas aeruginosa* and *trichoderma harzianum* using solanum lycopersicum as test plant. Adeyinka. *AJSSPN* 2 (2): 1–13. 2017.

ADALBERTO, Paulo Roberto. Produção, isolamento e caracterização de 'beta'-galactosidases de *Trichoderma reesei*: interação de íons metálicos na atividade enzimática. 2005.

ADAMS, Godleads Omokhagbor *et al.* Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28-39, 2015.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, p. 17-43, 2010.

ANP. 2022. **Petróleo**. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petrolo-e-derivados2/petroleo>. Acesso em: Julho de 2022.

ARUN, A.; EYINI, M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. **Bioresource technology**, v. 102, n. 17, p. 8063-8070, 2011.

AUTRY, Andrew R.; ELLIS, Gary M. Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental progress**, v. 11, n. 4, p. 318-323, 1992.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of microbiological methods**, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.

BANAT, Ibrahim M. *et al.* Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 697, 2014.

BERTHE-CORTI, L.; FETZNER, S. Bacterial Metabolism of n-Alkanes and Ammonia under Oxidic, Suboxic and Anoxic Conditions. **Acta Biotechnologica**, v. 22, n. 3-4, p. 299-336, 2002.

BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 7, p. 1277-1288, 2010.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. **Canadian journal of botany**, v. 62, n. 5, p. 924-931, 1984.

BISSETT, John. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian journal of botany**, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.

BORGES DE ASSIS, Thariny Farias *et al.* Utilização de Fungos na Degradação de Compostos Fenólicos de Derivados de Petróleo. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.

CAI, Feng; DRUZHININA, Irina S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal Diversity**, v. 107, n. 1, p. 1-69, 2021.

CALLERA, Welder Franzini Amaral. Estudos de mecanismos redox enzimáticos por Eletroquímica e Modelagem Computacional. 2017.

CANET, Rodolfo *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource technology**, v. 76, n. 2, p. 113-117, 2001.

CASTIGLIONI, Gabriel Luis; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 292-295, 2009.

CÁUPER, Luciana Lima De Brito; CÁUPER, Fábio Raphael Moreira; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Biosurfactant production by rhizobacteria isolated from Amazonian soils. **Volume 12**, 2021.

CÁUPER, Luciana Lima de Brito *et al.* Degradação de petróleo e derivados por isolados de rizobactérias e *Trichodermas* spp. 2018.

CARRERAS-VILLASEÑOR, Nohemí; SÁNCHEZ-ARREGUÍN, José Alejandro; HERRERA-ESTRELLA, Alfredo H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 3-16, 2012.

CERNIGLIA, Carl E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current opinion in biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 331-338, 1993.

CETESB – Companhia de Tecnologia Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Acidentes ambientais**. Disponível em <http://cetesb.sp.gov.br>. Acesso: mar de 2022.

CHANDRA, Mahesh *et al.* Cellulase production by six *Trichoderma* spp. fermented on medicinal plant processings. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 605-609, 2009.

CHEN, Guanrong; UETA, Tetsushi. Yet another chaotic attractor. **International Journal of Bifurcation and chaos**, v. 9, n. 07, p. 1465-1466, 1999.

COCAIGN, Angélique *et al.* Biotransformation of *Trichoderma* spp. and their tolerance to aromatic amines, a major class of pollutants. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4719-4726, 2013.

CORABI-ADELL, Carlo. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 2005.

CRAPEZ, M. A. C. *et al.* Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, p. 32-37, 2002.

CRUZ, Georgiana Feitosa da; MARSAIOLI, Anita Jocelyne. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Química Nova**, v. 35, p. 1628-1634, 2012.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

CORABI-ADELL, Carlo. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. 2005.

DEANGELIS, Kristen M. 2007. **Phosphate buffer**. Disponível em: <<https://www.unl.edu/cahoonlab/phosphate%20buffer.pdf>>, acesso: abril 2022.

DELABONA, Priscila da Silva. Produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum* para o processo de sacarificação da biomassa vegetal. 2015.

DE LIMA, Thayse Alves *et al.* Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DE SOUSA, Karina Camargo *et al.* Biorremediação de solos contaminado por hidrocarbonetos utilizando fungos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 43-52, 2016.

DE SOUZA, Daniela Boaneres *et al.* Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. **Revista de estudos ambientais**, v. 12, n. 2, p. 38-46, 2010.

DRUZHININA, Irina S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

EMBRAPA, SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO NA *et al.* Integrando esforços para o desenvolvimento da Amazônia. **Embrapa Amazônia Ocidental-Outras publicações científicas (ALICE)**, 2009.

ESPOSITO, Elisa; SILVA, Manuela da. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical reviews in microbiology**, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

ETHUR, Luciana Zago *et al.* **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

DA SILVA PATEKOSKI, Katya; PIRES-ZOTTARELLI, Carmen Lidia Amorim. Efeito de *trichoderma* spp. no controle de podridão de raiz causada por *pythium aphanidermatum* e na promoção de crescimento da alface hidropônica. **Acta Scientiae Biological Research**, v. 1, n. 1, p. 59-74, 2016.

DE CARVALHO FONTES, Livia *et al.* **Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados.** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Ciências Biomédicas.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of. *Trichoderma and Gliocladium*, p. 3-31, 2002.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 8-24, 2001.

HAMZAH, Ainon *et al.* Optimal physical and nutrient parameters for growth of *Trichoderma virens* UKMP-1M for heavy crude oil degradation. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 1, p. 71-79, 2012.

HANSON, K. G.; DESAI, Jitendra D.; DESAI, Anjana J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.

HARMAN, Gary E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HARMAN, Gary E. *et al.* *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HOREL, A.; SCHIEWER, S. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. **Cold Regions Science and Technology**, v. 58, n. 3, p. 113-119, 2009.

ISAIAS, Carolina Oliveira *et al.* Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 34-41, 2014.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti *et al.* Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 280-287, 2010.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. 2005a.

JACQUES, Rodrigo JS *et al.* Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 56, n. 3, p. 143-150, 2005b.

JOHNSON, Von *et al.* Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology letters**, v. 14, n. 6, p. 487-490, 1992.

KOTA, M. F. *et al.* Bioremediation of crude oil by different fungal genera. **Asian Journal of Plant Biology**, v. 2, n. 1, p. 11-18, 2014.

KREDICS, László et al. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 2003.

KUHLS, Katrin et al. Revision of *Trichoderma* sect. Longibrachiatum including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, v. 89, n. 3, p. 442-460, 1997.

LEE, Kok Chang; DARA, Ibrahim; IBRAHIM, Che Omar. A laboratory scale bioremediation of Tapis crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Acinetobacter baumannii* T30C. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 18, p. 2609-2615, 2011.

LEELAVATHI, M. S.; VANI, L.; REENA, Pascal. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 3, n. 1, p. 96-103, 2014.

LEMO, Judith Liliana Solórzano et al. Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). 2008.

LIMA, M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação de resíduos de petróleo e óleo vegetal. In: **Congresso De Iniciação Científica E Tecnológica Em Engenharia-CRiCTE**, 2006.

LIU, Pao-Wen Grace et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1119-1127, 2011.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African journal of Biotechnology**, v. 6, n. 1, 2007.

MARIANO, Adriano Pinto et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, 2008.

MARQUÉS, A. M. et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and physics of lipids**, v. 158, n. 2, p. 110-117, 2009.

MARTINS, Carolina Yamamoto Santos. Promoção de crescimento e colonização radicular por *trichoderma* spp em pinhão manso (*Ricinus communis* l). 2013.

MARTINS, Vilásia Guimarães et al. LEE. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 9-10, p. 721-726, 2006.

MELO LINS DE AZEVEDO, Liana. **Potencial de degradação do petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MENEGHETTI, Liliane Rebecchi Ribeiro et al. Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. 2007.

MENEZES, Nadionara Costa et al. Crescimento de fungos do gênero *Trichoderma* spp. em contato com gasolina. **Diversidade microbiana da Amazônia-vol. 3**, pgs. 116-119, 2019.

MEHRALIPOUR, Jamal; SAMARGHANDI, Mohammd Reza; RAHIMPOOR, Razzagh. Evaluation of exposure to BTEX in hookah smokers and carcinogenic and non-carcinogenic risk assessment. **Iranian Journal of Health, Safety and Environment**, v. 5, n. 4, p. 1128-1131, 2018.

MORGAN, Philip; WATKINSON, Robert J. Biodegradation of components of petroleum. In: **Biochemistry of microbial degradation**. Springer, Dordrecht, 1994. p. 1-31.

MOURA, Débora Carla Guimarães; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Capacidade de microrganismos autóctones de solos amazônicos em usar o petróleo como fonte de carbono com meios nutricionais distintos. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, pgs. 218-224, 2017.

MUKHERJEE, Prasun K. *et al.* *Trichoderma* research in the genome era. **Annu Rev Phytopathol**, v. 51, n. 1, p. 105-129, 2013.

MUTNURI, Srikanth; VASUDEVAN, N.; KAESTNER, Matthias. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 569-576, 2005.

NAZARETH, Sarita; MARBANIANG, Tabitha. Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 5, p. 363-369, 2008.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, Nathasha Fernandes de *et al.* Efeitos de fatores físico-químicos na produção de biomassa, colorantes e antibióticos por fungos *Trichoderma* spp. 2021.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado pela aplicação de surfactante químico e biossurfactante produzido por *Pseudomons aeruginosa*. *Disponível em:*

<http://www.revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Luciano%20Marcondes%20de%20OLIVEIRA.pdf>. Acesso em: mar de 2022.

OTSUKA, Ayumi de Aquino. Avaliação da biodegradação de tolueno por fungos isolados de ambientes associados ao petróleo. 2015.

PANDEY, Ashok *et al.* Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PEDROZO, Maria de Fátima Menezes *et al.* Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. **Centro de Recursos Ambientais**, v. 12, p. 246, 2002.

PESÁNTEZ, Marcia; CASTRO, Rosa. Potencial de cepas de *Trichoderma* spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. **Biotecnología Vegetal**, v. 16, n. 4, 2016.

PETERS, Kenneth Eric *et al.* **The biomarker guide**. Cambridge university press, 2005.

PIRÔLLO, Maria Paula Santos. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006.

RAHMAN, Pattanathu KSM; GAKPE, Edward. Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. **Biotechnology**, 2008.

RIFAI, Mien A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.

ROCHA, Patrícia Maria. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. 2017.

RODRIGUES, E. *et al.* Resumos do 18º Simpósio Nacional de Bioprocessos. 2010.

SAITO, Larissa Romao *et al.* Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 2, n. 3, p. 203-216, 2011.

SANCHES, Rafael de Jesus. Seleção de micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel. 2009.

SANTOS, Henrique F. *et al.* Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, n. 1, p. 329-350, 2011.

SANTOS, Letícia Cotia dos. Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. 2003.

SAVAGE, Kristen N. *et al.* Biodegradation of low-molecular-weight alkanes under mesophilic, sulfate-reducing conditions: metabolic intermediates and community patterns. **FEMS microbiology ecology**, v. 72, n. 3, p. 485-495, 2010.

SAWADOGO, Adama *et al.* Optimization of Hydrocarbons Biodegradation by Bacterial Strains Isolated from Wastewaters in Ouagadougou, Burkina Faso: Case Study of Diesel and Used Lubricating Oils. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 652-657, 2015.

SCHUSTER, André; SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SEABRA, P. N. C. Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados. **Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ, Tese M. Sc**, 1997.

SEO, Jong-Su; KEUM, Young-Soo; LI, Qing X. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International journal of environmental research and public health**, v. 6, n. 1, p. 278-309, 2009.

SHENTU, Xuping *et al.* Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. **Brazilian journal of microbiology**, v. 45, p. 248-254, 2014.

SINGH, Harbhajan. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. John Wiley & Sons, 2006.

SILVA, Luana Monteiro *et al.* Biodegradação de hidrocarbonetos por rizobactérias em solo de várzea da Região Amazônica contaminado com petróleo e óleo diesel. 2018.

SILVA DO ESPÍRITO SANTO, Lidiane. **Biodegradabilidade de óleo Diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente.** 2002. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SHUKLA, Dhara; VANKAR, Padma S. Role of *Trichoderma* species in bioremediation process: biosorption studies on hexavalent chromium. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Elsevier, 2014. p. 405-412.

SOUZA, Cynthia S. et al. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: **Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás**. 2005.

SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira Chagas et al. Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel. 2007.

TONINI, Rita Maria Costa Wetler; DE REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.

TORSVIK, Vigdis; ØVREÅS, Lise; THINGSTAD, Tron Frede. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

VAN HAMME, Jonathan D.; SINGH, Ajay; WARD, Owen P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VINALE, Francesco *et al.* *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.

WANG, Lei *et al.* Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 347-356, 2006.

WEBER, Bruna Daniela; SANTOS, Antenor Aguiar. Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. **Engenharia Ambiental (Online) - Espírito Santo do Pinhal**, v. 10, n. 1, p. 114-133, 2013.

YOUSSEF, Noha H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of microbiological methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZANCAN, Willian Luis Antonio et al. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v. 28, n. 5, p. 782-789, 2012.

APÊNDICES

Apêndice A. Protocolo de identificação de *Trichoderma* spp.**PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE TRICHODERMA****Características Macroscópicas****Nome da cultura:** _____**Espécie:** _____**Período de incubação:** _____**1. Tamanho do diâmetro da colônia:** _____**2. Tipos de textura:** _____**3. Topografia da superfície:** _____**4. Descrição da morfologia do centro:** _____**5. Consistência:** _____**6. Características microscópicas:**

--	--	--

7. Medidas das microestruturas da colônia:

CONIDIÓFOROS			CLAMIDÓSPORO		FIALIDE		CONÍDIOS		
Comp.	Larg.	Qt. Fiali.	Comp.	Larg.	Comp.	Diam.	Comp.	Larg.	Carac.

Micélio/Hifa: _____**Septada / Cenocítico; Hialino / Escuro; Diâmetro / Prosenquima; Etc.****Esporóforos:** _____**Simples / Ramificado / Vesícula / Esterigma / Fialídes / Etc.****Conídios:** _____**Hialino / Escuro / Simples / Em cadeia / Septado / Formatado / Etc.****Outros:** _____**Clamidósporo / Seta / Formação de estrutura com picnídio**

Apêndice B - Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação, em meio INPA com nafta como fonte de carbono

Isolados	DCPIP mg/L ⁻¹											
	0 hora		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas	
Controle	2,66	± 0,00	2,77	± 0,01	2,68	± 0,00	2,58	± 0,00	2,57	± 0,00	2,60	± 0,01
INPA F1	2,66	± 0,00	2,71	± 0,00	2,38	± 0,02	2,86	± 0,00	2,88	± 0,00	2,30	± 0,04
INPA F2	2,26	± 0,00	2,53	± 0,01	2,63	± 0,00	2,32	± 0,03	2,44	± 0,03	2,14	± 0,00
INPA F3	2,13	± 0,00	2,43	± 0,00	2,17	± 0,00	2,66	± 0,00	2,51	± 0,00	2,38	± 0,02
INPA F4	2,06	± 0,00	2,04	± 0,01	2,55	± 0,01	2,15	± 0,05	2,20	± 0,08	2,54	± 0,12
INPA F5	2,10	± 0,00	2,45	± 0,00	2,29	± 0,01	2,43	± 0,00	2,78	± 0,00	2,46	± 0,00
INPA F6	2,26	± 0,01	2,66	± 0,00	2,31	± 0,01	2,17	± 0,03	2,17	± 0,00	2,32	± 0,00
INPA F7	2,21	± 0,00	2,76	± 0,04	2,33	± 0,00	2,13	± 0,00	2,67	± 0,00	2,42	± 0,01
INPA F8	2,31	± 0,00	2,24	± 0,00	2,34	± 0,00	1,77	± 0,01	1,85	± 0,00	1,86	± 0,00
INPA F9	2,18	± 0,00	2,51	± 0,00	2,03	± 0,04	2,35	± 0,04	2,34	± 0,00	3,00	± 0,00
INPA F10	2,26	± 0,01	2,60	± 0,02	2,46	± 0,01	2,00	± 0,00	2,28	± 0,01	2,64	± 0,00
INPA F11	2,62	± 0,00	2,46	± 0,00	2,38	± 0,01	2,22	± 0,02	2,91	± 0,05	3,00	± 0,00
INPA F12	2,55	± 0,01	2,26	± 0,01	2,66	± 0,00	1,85	± 0,01	2,10	± 0,08	1,73	± 0,00
INPA F13	2,14	± 0,00	2,31	± 0,01	2,19	± 0,00	2,28	± 0,00	2,60	± 0,04	2,63	± 0,00
INPA F14	2,18	± 0,00	2,56	± 0,00	2,34	± 0,03	1,97	± 0,03	2,44	± 0,11	2,21	± 0,02
INPA F15	2,69	± 0,01	2,53	± 0,02	2,45	± 0,04	2,17	± 0,02	2,10	± 0,02	1,97	± 0,02
INPA F16	2,69	± 0,02	2,53	± 0,00	2,49	± 0,01	2,75	± 0,04	2,86	± 0,00	2,63	± 0,01
INPA F17	2,34	± 0,00	2,34	± 0,00	2,26	± 0,01	1,96	± 0,02	2,02	± 0,03	2,40	± 0,00
INPA F18	2,77	± 0,00	2,31	± 0,00	2,33	± 0,00	2,30	± 0,01	2,66	± 0,09	2,51	± 0,00
INPA F19	2,75	± 0,01	2,58	± 0,00	2,52	± 0,01	2,40	± 0,05	3,13	± 0,00	2,45	± 0,00
INPA F20	2,66	± 0,00	2,31	± 0,00	2,31	± 0,00	1,98	± 0,03	2,25	± 0,06	1,84	± 0,00
INPA F21	2,34	± 0,00	2,72	± 0,02	2,25	± 0,00	2,00	± 0,00	1,95	± 0,00	1,92	± 0,01
INPA F22	2,34	± 0,03	2,64	± 0,00	2,45	± 0,00	2,11	± 0,00	2,65	± 0,05	2,17	± 0,00
INPA F23	2,06	± 0,00	1,96	± 0,00	1,99	± 0,01	1,98	± 0,00	2,01	± 0,01	2,42	± 0,04
INPA F24	2,21	± 0,04	2,03	± 0,00	1,99	± 0,00	2,45	± 0,06	2,70	± 0,00	2,49	± 0,00
INPA F25	2,26	± 0,01	2,34	± 0,00	2,31	± 0,00	1,70	± 0,01	1,79	± 0,00	1,96	± 0,00
INPA F26	2,12	± 0,00	2,12	± 0,00	2,05	± 0,00	2,12	± 0,01	2,76	± 0,00	2,65	± 0,04
INPA F27	2,10	± 0,00	1,94	± 0,00	2,01	± 0,00	1,89	± 0,01	2,04	± 0,00	2,85	± 0,00
INPA F28	2,18	± 0,01	1,85	± 0,01	2,32	± 0,02	2,12	± 0,06	2,60	± 0,14	2,88	± 0,08
INPA F29	2,66	± 0,00	2,31	± 0,00	2,26	± 0,01	1,80	± 0,02	1,85	± 0,00	2,19	± 0,00
INPA F30	2,08	± 0,02	2,12	± 0,01	2,26	± 0,00	2,17	± 0,02	2,81	± 0,01	2,44	± 0,00
INPA F31	2,15	± 0,00	2,19	± 0,00	1,98	± 0,01	2,06	± 0,05	2,06	± 0,00	2,28	± 0,00
INPA F32	2,30	± 0,00	2,57	± 0,01	2,38	± 0,00	2,04	± 0,00	1,97	± 0,00	2,19	± 0,05
INPA F33	2,04	± 0,01	2,46	± 0,00	2,04	± 0,01	1,85	± 0,04	1,72	± 0,00	1,96	± 0,00
INPA F34	2,04	± 0,00	2,09	± 0,00	2,02	± 0,00	2,25	± 0,00	2,52	± 0,00	2,09	± 0,00
INPA F35	2,09	± 0,00	2,08	± 0,02	2,13	± 0,04	1,85	± 0,01	1,87	± 0,01	2,51	± 0,00

INPA F36	2,21	± 0,05	2,62	± 0,01	2,08	± 0,02	2,05	± 0,00	1,88	± 0,02	2,10	± 0,000
INPA F37	2,31	± 0,00	2,28	± 0,00	2,38	± 0,00	1,86	± 0,00	2,38	± 0,00	2,26	± 0,06
INPA F38	2,26	± 0,01	2,26	± 0,01	2,55	± 0,01	1,74	± 0,00	2,08	± 0,05	1,99	± 0,00
INPA F39	2,03	± 0,00	2,08	± 0,01	2,04	± 0,01	2,42	± 0,03	2,59	± 0,00	2,60	± 0,09
INPA F40	2,42	± 0,02	2,55	± 0,01	2,51	± 0,00	2,15	± 0,00	2,25	± 0,00	2,27	± 0,00
INPA F41	2,04	± 0,01	2,66	± 0,00	2,66	± 0,00	1,68	± 0,00	1,82	± 0,01	2,64	± 0,02
INPA F42	2,03	± 0,00	2,97	± 0,00	2,05	± 0,00	2,37	± 0,07	2,66	± 0,07	2,38	± 0,08
INPA F43	2,75	± 0,04	1,84	± 0,00	1,89	± 0,00	1,98	± 0,00	1,98	± 0,01	1,91	± 0,04

Apêndice C - Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação, em meio INPA com gasolina como fonte de carbono

Isolados	DCPIP mg/L ⁻¹											
	0 hora		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas	
Controle	2,83	± 0,02	3,02	± 0,00	2,67	± 0,00	2,64	± 0,00	2,55	± 0,00	2,62	± 0,03
INPA F1	3,09	± 0,04	2,73	± 0,01	2,43	± 0,01	2,56	± 0,01	2,43	± 0,03	2,75	± 0,04
INPA F2	2,70	± 0,08	2,48	± 0,00	2,32	± 0,00	2,11	± 0,01	2,27	± 0,01	2,09	± 0,00
INPA F3	2,23	± 0,00	2,86	± 0,00	2,05	± 0,01	3,03	± 0,00	2,61	± 0,00	2,50	± 0,00
INPA F4	2,36	± 0,00	3,09	± 0,04	2,57	± 0,01	2,13	± 0,00	1,87	± 0,00	1,86	± 0,00
INPA F5	2,16	± 0,00	2,82	± 0,03	2,16	± 0,00	2,71	± 0,00	2,64	± 0,02	2,61	± 0,00
INPA F6	2,26	± 0,00	2,53	± 0,00	2,22	± 0,01	2,13	± 0,00	2,28	± 0,02	2,17	± 0,02
INPA F7	2,35	± 0,03	2,57	± 0,01	2,51	± 0,00	2,12	± 0,01	2,17	± 0,02	2,04	± 0,00
INPA F8	2,51	± 0,00	2,57	± 0,00	2,57	± 0,00	1,79	± 0,00	1,85	± 0,00	1,88	± 0,00
INPA F9	2,17	± 0,01	2,54	± 0,02	2,18	± 0,03	2,66	± 0,00	3,14	± 0,00	3,08	± 0,00
INPA F10	2,14	± 0,01	2,47	± 0,00	2,31	± 0,01	2,22	± 0,04	2,48	± 0,00	2,37	± 0,00
INPA F11	2,84	± 0,00	2,79	± 0,01	2,52	± 0,03	2,67	± 0,08	2,28	± 0,00	2,95	± 0,00
INPA F12	2,57	± 0,01	2,51	± 0,00	2,36	± 0,00	2,17	± 0,00	2,58	± 0,10	1,94	± 0,00
INPA F13	2,52	± 0,00	2,80	± 0,04	2,10	± 0,01	2,85	± 0,00	2,69	± 0,00	2,72	± 0,11
INPA F14	2,18	± 0,00	2,51	± 0,04	1,99	± 0,04	1,93	± 0,01	2,41	± 0,00	2,29	± 0,02
INPA F15	2,91	± 0,04	3,02	± 0,07	2,46	± 0,00	2,65	± 0,00	2,40	± 0,00	2,85	± 0,12
INPA F16	2,78	± 0,00	2,67	± 0,01	2,57	± 0,00	2,83	± 0,00	2,98	± 0,06	3,41	± 0,08
INPA F17	2,57	± 0,00	2,36	± 0,00	2,10	± 0,01	2,03	± 0,00	2,41	± 0,01	1,76	± 0,01
INPA F18	2,77	± 0,00	2,75	± 0,00	2,10	± 0,00	3,63	± 0,00	2,43	± 0,05	2,41	± 0,00
INPA F19	2,83	± 0,00	2,83	± 0,00	2,36	± 0,04	2,62	± 0,02	2,51	± 0,09	2,67	± 0,07
INPA F20	1,98	± 0,02	2,51	± 0,00	2,57	± 0,01	2,11	± 0,00	2,21	± 0,05	1,79	± 0,00
INPA F21	2,05	± 0,00	2,11	± 0,00	1,82	± 0,00	1,99	± 0,00	2,00	± 0,00	1,92	± 0,01
INPA F22	2,15	± 0,00	2,39	± 0,00	2,21	± 0,03	2,32	± 0,00	2,44	± 0,02	2,17	± 0,00
INPA F23	1,98	± 0,00	2,05	± 0,00	1,95	± 0,01	2,08	± 0,02	1,99	± 0,01	2,42	± 0,04
INPA F24	2,05	± 0,00	2,20	± 0,00	2,00	± 0,00	2,45	± 0,03	2,57	± 0,00	2,49	± 0,00
INPA F25	2,05	± 0,00	2,36	± 0,00	1,70	± 0,00	1,85	± 0,00	1,95	± 0,00	1,96	± 0,00
INPA F26	2,01	± 0,00	2,09	± 0,00	2,23	± 0,02	2,24	± 0,00	2,54	± 0,00	2,65	± 0,04
INPA F27	2,22	± 0,01	2,06	± 0,00	1,97	± 0,02	2,25	± 0,05	2,03	± 0,01	2,85	± 0,00
INPA F28	2,11	± 0,00	2,05	± 0,00	1,98	± 0,01	2,17	± 0,01	2,20	± 0,00	2,88	± 0,08
INPA F29	2,36	± 0,00	1,98	± 0,02	1,76	± 0,00	1,92	± 0,00	2,08	± 0,00	2,19	± 0,00
INPA F30	1,90	± 0,00	2,06	± 0,00	2,23	± 0,07	2,34	± 0,02	2,26	± 0,00	2,44	± 0,00
INPA F31	1,99	± 0,00	1,97	± 0,00	1,97	± 0,02	2,30	± 0,00	2,22	± 0,00	2,28	± 0,00
INPA F32	2,19	± 0,02	2,18	± 0,05	2,14	± 0,00	2,49	± 0,00	2,13	± 0,00	2,19	± 0,05
INPA F33	2,05	± 0,00	2,05	± 0,00	1,65	± 0,00	1,99	± 0,00	1,97	± 0,03	1,96	± 0,00
INPA F34	1,93	± 0,00	2,09	± 0,00	2,03	± 0,02	2,23	± 0,00	2,71	± 0,00	2,09	± 0,00
INPA F35	2,10	± 0,03	1,92	± 0,00	1,99	± 0,03	2,12	± 0,05	2,14	± 0,00	2,51	± 0,00

INPA F36	2,11	± 0,01	1,96	± 0,00	1,95	± 0,01	1,97	± 0,02	2,00	± 0,02	2,10	± 0,00
INPA F37	2,19	± 0,00	2,02	± 0,00	1,83	± 0,01	2,29	± 0,03	2,16	± 0,00	2,26	± 0,06
INPA F38	2,36	± 0,00	2,05	± 0,00	1,81	± 0,00	2,02	± 0,04	2,44	± 0,00	1,99	± 0,00
INPA F39	2,15	± 0,00	1,96	± 0,02	1,83	± 0,00	2,01	± 0,00	2,67	± 0,00	2,60	± 0,09
INPA F40	2,19	± 0,03	2,18	± 0,00	2,09	± 0,00	2,44	± 0,00	2,35	± 0,03	2,27	± 0,00
INPA F41	2,05	± 0,00	1,98	± 0,02	1,71	± 0,01	2,06	± 0,05	2,07	± 0,00	2,64	± 0,02
INPA F42	1,91	± 0,00	2,04	± 0,00	1,84	± 0,00	2,12	± 0,00	1,94	± 0,00	2,38	± 0,00
INPA F43	2,31	± 0,01	1,93	± 0,00	2,17	± 0,00	2,23	± 0,02	2,06	± 0,00	2,46	± 0,00

Apêndice D - Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação, em meio INPA com querosene como fonte de carbono

Isolados	DCPIP mg/L ⁻¹					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	2,89 ± 0,00	2,82 ± 0,00	2,69 ± 0,01	2,88 ± 0,00	2,52 ± 0,00	2,64 ± 0,02
INPA F1	2,91 ± 0,00	2,49 ± 0,00	2,38 ± 0,02	2,97 ± 0,00	2,32 ± 0,02	2,86 ± 0,01
INPA F2	2,16 ± 0,00	3,63 ± 0,00	2,38 ± 0,00	2,81 ± 0,00	2,68 ± 0,00	2,22 ± 0,00
INPA F3	1,97 ± 0,00	2,21 ± 0,00	2,01 ± 0,00	2,40 ± 0,00	2,52 ± 0,06	1,81 ± 0,00
INPA F4	2,08 ± 0,00	2,11 ± 0,02	2,33 ± 0,00	1,96 ± 0,00	1,89 ± 0,03	1,82 ± 0,00
INPA F5	1,98 ± 0,00	2,16 ± 0,00	2,08 ± 0,00	2,52 ± 0,01	2,48 ± 0,00	2,09 ± 0,00
INPA F6	2,24 ± 0,01	2,82 ± 0,04	2,28 ± 0,00	2,69 ± 0,03	2,71 ± 0,03	2,45 ± 0,02
INPA F7	2,21 ± 0,00	2,44 ± 0,00	2,28 ± 0,00	2,57 ± 0,06	2,04 ± 0,00	2,35 ± 0,05
INPA F8	3,63 ± 0,00	2,08 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,81 ± 0,01	1,95 ± 0,00	2,10 ± 0,00
INPA F9	1,97 ± 0,01	2,11 ± 0,00	1,96 ± 0,02	2,53 ± 0,00	2,66 ± 0,14	1,77 ± 0,00
INPA F10	2,25 ± 0,00	2,79 ± 0,00	2,25 ± 0,00	2,22 ± 0,00	2,56 ± 0,00	2,76 ± 0,06
INPA F11	2,78 ± 0,00	2,56 ± 0,03	2,39 ± 0,00	2,71 ± 0,00	2,25 ± 0,02	2,37 ± 0,03
INPA F12	2,11 ± 0,02	2,08 ± 0,00	2,11 ± 0,02	1,94 ± 0,02	1,91 ± 0,03	1,90 ± 0,04
INPA F13	1,98 ± 0,01	2,30 ± 0,00	2,12 ± 0,01	2,36 ± 0,03	2,30 ± 0,01	2,02 ± 0,00
INPA F14	2,21 ± 0,00	2,20 ± 0,00	2,33 ± 0,01	2,52 ± 0,00	2,93 ± 0,00	2,63 ± 0,00
INPA F15	2,84 ± 0,00	2,59 ± 0,01	2,34 ± 0,01	2,27 ± 0,01	2,11 ± 0,00	2,36 ± 0,00
INPA F16	2,88 ± 0,00	2,32 ± 0,01	2,44 ± 0,00	2,89 ± 0,03	2,64 ± 0,00	2,73 ± 0,02
INPA F17	2,08 ± 0,00	1,97 ± 0,00	2,11 ± 0,02	2,05 ± 0,03	2,09 ± 0,00	2,00 ± 0,04
INPA F18	1,95 ± 0,00	2,11 ± 0,02	1,93 ± 0,00	2,32 ± 0,02	2,33 ± 0,00	1,91 ± 0,04
INPA F19	2,94 ± 0,02	2,68 ± 0,00	2,31 ± 0,01	2,86 ± 0,00	2,65 ± 0,11	2,89 ± 0,00
INPA F20	2,38 ± 0,02	2,07 ± 0,00	2,08 ± 0,00	2,12 ± 0,01	1,94 ± 0,00	1,80 ± 0,00
INPA F21	2,04 ± 0,00	2,03 ± 0,00	2,42 ± 0,04	2,23 ± 0,00	2,03 ± 0,00	2,00 ± 0,00
INPA F22	2,02 ± 0,00	2,04 ± 0,01	2,58 ± 0,02	2,39 ± 0,04	2,14 ± 0,00	2,29 ± 0,03
INPA F23	2,05 ± 0,00	1,90 ± 0,00	1,99 ± 0,00	1,98 ± 0,00	1,94 ± 0,01	2,19 ± 0,00
INPA F24	1,89 ± 0,00	2,57 ± 0,00	2,04 ± 0,01	2,08 ± 0,03	2,20 ± 0,01	1,85 ± 0,00
INPA F25	1,97 ± 0,00	1,97 ± 0,00	2,11 ± 0,02	1,68 ± 0,00	1,87 ± 0,01	1,77 ± 0,00
INPA F26	1,91 ± 0,00	2,65 ± 0,00	2,15 ± 0,00	2,13 ± 0,02	2,24 ± 0,05	2,00 ± 0,01
INPA F27	2,08 ± 0,00	2,01 ± 0,00	2,08 ± 0,00	2,13 ± 0,00	1,92 ± 0,00	2,42 ± 0,00
INPA F28	2,07 ± 0,00	1,87 ± 0,00	2,10 ± 0,00	2,16 ± 0,00	1,94 ± 0,00	2,05 ± 0,00
INPA F29	2,11 ± 0,02	2,33 ± 0,00	2,07 ± 0,00	1,76 ± 0,00	1,89 ± 0,00	2,04 ± 0,00
INPA F30	1,90 ± 0,00	2,20 ± 0,04	2,01 ± 0,01	2,16 ± 0,00	2,07 ± 0,02	1,96 ± 0,01
INPA F31	2,09 ± 0,00	1,87 ± 0,01	1,90 ± 0,00	1,81 ± 0,01	1,86 ± 0,00	1,96 ± 0,00
INPA F32	2,01 ± 0,00	1,91 ± 0,00	2,40 ± 0,00	2,26 ± 0,01	1,92 ± 0,02	1,88 ± 0,00
INPA F33	2,26 ± 0,00	2,11 ± 0,02	2,33 ± 0,00	1,70 ± 0,01	1,82 ± 0,00	1,92 ± 0,00
INPA F34	1,87 ± 0,01	2,41 ± 0,00	2,07 ± 0,00	2,12 ± 0,02	2,31 ± 0,00	1,86 ± 0,00
INPA F35	2,03 ± 0,00	1,84 ± 0,00	1,97 ± 0,01	1,87 ± 0,00	1,80 ± 0,00	2,16 ± 0,00

INPA F36	2,07 ± 0,00	1,96 ± 0,01	2,20 ± 0,08	1,91 ± 0,03	1,92 ± 0,02	2,28 ± 0,05
INPA F37	2,01 ± 0,00	1,94 ± 0,01	2,51 ± 0,00	2,08 ± 0,01	1,81 ± 0,00	2,07 ± 0,07
INPA F38	1,97 ± 0,00	2,33 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,68 ± 0,00	1,85 ± 0,00	1,78 ± 0,00
INPA F39	1,92 ± 0,00	2,51 ± 0,00	1,94 ± 0,00	1,97 ± 0,00	2,21 ± 0,05	1,81 ± 0,00
INPA F40	2,01 ± 0,00	1,99 ± 0,00	2,45 ± 0,00	2,26 ± 0,00	2,85 ± 0,00	2,41 ± 0,00
INPA F41	2,11 ± 0,02	2,11 ± 0,02	2,33 ± 0,00	1,68 ± 0,00	1,77 ± 0,00	1,92 ± 0,02
INPA F42	2,35 ± 0,00	3,15 ± 0,00	2,47 ± 0,06	2,88 ± 0,02	3,01 ± 0,00	2,96 ± 0,05
INPA F43	2,54 ± 0,03	2,08 ± 0,01	2,51 ± 0,04	2,42 ± 0,00	2,04 ± 0,05	2,20 ± 0,02

Apêndice E - Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação, em meio INPA com óleo diesel como fonte de carbono

Isolados	DCPIP mg/L ⁻¹					
	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Controle	2,78 ± 0,06	2,88 ± 0,00	2,78 ± 0,03	2,78 ± 0,00	2,79 ± 0,00	2,75 ± 0,00
INPA F1	2,71 ± 0,06	2,48 ± 0,00	2,45 ± 0,01	2,46 ± 0,01	3,04 ± 0,09	2,51 ± 0,02
INPA F2	2,55 ± 0,00	2,70 ± 0,02	2,47 ± 0,00	2,56 ± 0,00	2,40 ± 0,00	2,07 ± 0,00
INPA F3	1,96 ± 0,00	1,98 ± 0,00	2,14 ± 0,00	2,37 ± 0,03	2,42 ± 0,00	1,73 ± 0,00
INPA F4	2,02 ± 0,00	2,31 ± 0,02	2,31 ± 0,02	1,82 ± 0,01	1,76 ± 0,00	2,07 ± 0,03
INPA F5	1,99 ± 0,00	2,13 ± 0,00	2,55 ± 0,00	2,46 ± 0,00	2,55 ± 0,02	2,47 ± 0,00
INPA F6	2,48 ± 0,00	2,47 ± 0,00	2,46 ± 0,00	2,30 ± 0,02	2,44 ± 0,00	2,11 ± 0,00
INPA F7	2,46 ± 0,03	2,51 ± 0,03	2,53 ± 0,00	2,39 ± 0,02	2,03 ± 0,01	2,44 ± 0,00
INPA F8	2,22 ± 0,00	2,16 ± 0,03	2,71 ± 0,05	1,80 ± 0,00	1,73 ± 0,01	2,48 ± 0,00
INPA F9	1,99 ± 0,01	2,04 ± 0,00	2,06 ± 0,04	2,40 ± 0,00	2,35 ± 0,00	1,95 ± 0,04
INPA F10	2,46 ± 0,00	2,71 ± 0,02	2,80 ± 0,07	2,31 ± 0,04	2,28 ± 0,00	2,13 ± 0,03
INPA F11	3,16 ± 0,05	2,58 ± 0,01	2,48 ± 0,00	2,55 ± 0,00	2,30 ± 0,00	2,73 ± 0,03
INPA F12	2,31 ± 0,02	2,16 ± 0,00	2,31 ± 0,02	2,02 ± 0,06	1,71 ± 0,02	2,19 ± 0,00
INPA F13	1,96 ± 0,00	2,15 ± 0,01	2,37 ± 0,00	2,31 ± 0,00	2,28 ± 0,00	1,86 ± 0,02
INPA F14	2,51 ± 0,00	2,81 ± 0,00	2,84 ± 0,00	2,34 ± 0,05	2,59 ± 0,00	2,52 ± 0,02
INPA F15	2,41 ± 0,00	2,46 ± 0,00	2,49 ± 0,00	2,54 ± 0,08	2,82 ± 0,04	2,88 ± 0,06
INPA F16	2,31 ± 0,02	2,65 ± 0,00	2,63 ± 0,03	2,51 ± 0,00	2,37 ± 0,00	2,33 ± 0,01
INPA F17	2,16 ± 0,00	2,22 ± 0,00	2,64 ± 0,04	1,86 ± 0,01	1,94 ± 0,06	2,14 ± 0,00
INPA F18	1,93 ± 0,00	2,09 ± 0,01	2,20 ± 0,00	2,32 ± 0,00	2,67 ± 0,05	1,82 ± 0,02
INPA F19	2,96 ± 0,05	2,71 ± 0,05	2,31 ± 0,01	2,43 ± 0,06	2,34 ± 0,00	2,68 ± 0,00
INPA F20	2,10 ± 0,02	2,31 ± 0,02	2,19 ± 0,00	1,97 ± 0,01	2,20 ± 0,06	2,29 ± 0,06
INPA F21	2,00 ± 0,00	2,22 ± 0,03	1,96 ± 0,00	2,01 ± 0,00	2,02 ± 0,02	2,03 ± 0,00
INPA F22	2,02 ± 0,00	2,40 ± 0,00	2,19 ± 0,03	2,02 ± 0,00	2,31 ± 0,00	2,87 ± 0,00
INPA F23	2,02 ± 0,00	1,94 ± 0,00	2,08 ± 0,01	2,21 ± 0,00	2,41 ± 0,00	2,51 ± 0,00
INPA F24	2,02 ± 0,00	2,10 ± 0,00	2,01 ± 0,04	2,45 ± 0,00	2,37 ± 0,00	2,56 ± 0,00
INPA F25	1,89 ± 0,00	1,93 ± 0,01	2,31 ± 0,02	1,72 ± 0,00	1,74 ± 0,00	2,10 ± 0,00
INPA F26	1,99 ± 0,00	2,16 ± 0,00	1,89 ± 0,00	2,41 ± 0,00	2,40 ± 0,00	2,21 ± 0,00
INPA F27	2,01 ± 0,00	1,99 ± 0,00	2,05 ± 0,00	2,21 ± 0,04	2,34 ± 0,03	2,76 ± 0,01
INPA F28	2,19 ± 0,01	1,85 ± 0,01	2,51 ± 0,02	2,49 ± 0,04	2,00 ± 0,01	2,22 ± 0,01
INPA F29	1,96 ± 0,00	1,93 ± 0,00	2,23 ± 0,00	1,91 ± 0,02	1,84 ± 0,00	1,92 ± 0,00
INPA F30	1,99 ± 0,00	2,09 ± 0,00	2,14 ± 0,06	2,14 ± 0,05	2,11 ± 0,03	2,44 ± 0,00
INPA F31	2,07 ± 0,00	1,91 ± 0,00	2,09 ± 0,02	1,89 ± 0,00	1,92 ± 0,00	2,37 ± 0,00
INPA F32	2,06 ± 0,00	2,07 ± 0,00	2,16 ± 0,03	1,90 ± 0,02	2,53 ± 0,00	3,03 ± 0,09
INPA F33	1,93 ± 0,00	1,92 ± 0,00	2,12 ± 0,00	1,68 ± 0,01	1,73 ± 0,00	1,85 ± 0,00
INPA F34	1,98 ± 0,00	2,15 ± 0,01	1,90 ± 0,00	2,11 ± 0,02	2,44 ± 0,08	2,36 ± 0,00
INPA F35	2,02 ± 0,00	1,77 ± 0,00	2,12 ± 0,02	1,91 ± 0,00	2,03 ± 0,01	2,79 ± 0,03

INPA F36	2,01 ± 0,01	2,12 ± 0,04	1,93 ± 0,01	2,08 ± 0,00	2,04 ± 0,02	2,15 ± 0,03
INPA F37	1,95 ± 0,00	2,29 ± 0,00	1,93 ± 0,01	1,97 ± 0,03	1,76 ± 0,01	1,93 ± 0,00
INPA F38	2,10 ± 0,00	2,14 ± 0,06	2,11 ± 0,00	1,75 ± 0,00	1,76 ± 0,01	1,87 ± 0,00
INPA F39	1,94 ± 0,00	2,06 ± 0,00	1,79 ± 0,01	2,31 ± 0,00	1,95 ± 0,00	2,11 ± 0,00
INPA F40	2,01 ± 0,00	2,05 ± 0,00	2,22 ± 0,00	2,19 ± 0,06	2,17 ± 0,08	2,19 ± 0,01
INPA F41	1,89 ± 0,00	2,16 ± 0,03	1,93 ± 0,00	1,72 ± 0,01	1,79 ± 0,00	1,79 ± 0,00
INPA F42	2,31 ± 0,00	2,07 ± 0,00	2,07 ± 0,03	2,11 ± 0,00	2,48 ± 0,00	2,13 ± 0,03
INPA F43	2,51 ± 0,02	1,73 ± 0,00	2,47 ± 0,00	2,44 ± 0,00	1,95 ± 0,04	2,73 ± 0,03

Apêndice F - Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação, em meio INPA com óleo lubrificante como fonte de carbono

Isolados	DCPIP mg/L ⁻¹											
	0 hora		24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas	
Controle	2,28	± 0,00	2,68	± 0,00	2,76	± 0,00	2,78	± 0,00	2,61	± 0,00	2,53	± 0,03
INPA F1	2,55	± 0,00	2,61	± 0,03	2,41	± 0,00	2,46	± 0,01	2,64	± 0,00	2,73	± 0,03
INPA F2	2,07	± 0,00	2,68	± 0,00	2,32	± 0,00	2,56	± 0,00	2,51	± 0,00	2,27	± 0,02
INPA F3	2,40	± 0,00	1,89	± 0,00	2,14	± 0,00	2,37	± 0,03	2,77	± 0,03	2,10	± 0,00
INPA F4	1,89	± 0,00	2,14	± 0,00	2,02	± 0,00	1,82	± 0,01	1,83	± 0,00	1,70	± 0,00
INPA F5	1,95	± 0,00	2,02	± 0,02	2,25	± 0,00	2,46	± 0,00	2,78	± 0,00	2,19	± 0,04
INPA F6	2,28	± 0,00	2,67	± 0,00	2,10	± 0,00	2,30	± 0,02	2,40	± 0,00	2,09	± 0,01
INPA F7	2,13	± 0,00	2,55	± 0,02	2,48	± 0,01	2,39	± 0,02	2,47	± 0,06	1,98	± 0,01
INPA F8	1,96	± 0,00	2,14	± 0,00	1,94	± 0,01	1,80	± 0,00	2,06	± 0,01	2,86	± 0,17
INPA F9	1,94	± 0,00	2,03	± 0,02	2,24	± 0,03	2,40	± 0,00	2,68	± 0,09	2,15	± 0,03
INPA F10	2,18	± 0,01	2,40	± 0,00	2,34	± 0,03	2,31	± 0,04	2,26	± 0,00	1,95	± 0,00
INPA F11	2,35	± 0,00	2,50	± 0,00	2,26	± 0,05	2,55	± 0,00	2,54	± 0,00	2,33	± 0,00
INPA F12	2,10	± 0,00	2,23	± 0,02	1,89	± 0,01	2,02	± 0,06	2,02	± 0,00	2,69	± 0,19
INPA F13	1,95	± 0,00	2,12	± 0,00	2,20	± 0,00	2,31	± 0,00	2,54	± 0,00	2,29	± 0,00
INPA F14	2,17	± 0,00	2,34	± 0,00	2,21	± 0,00	2,34	± 0,05	2,89	± 0,00	2,04	± 0,00
INPA F15	2,68	± 0,00	2,38	± 0,01	2,42	± 0,08	2,54	± 0,08	2,70	± 0,11	2,93	± 0,11
INPA F16	2,39	± 0,00	2,33	± 0,02	2,23	± 0,02	2,51	± 0,00	2,31	± 0,00	2,88	± 0,00
INPA F17	1,89	± 0,01	2,10	± 0,00	1,96	± 0,00	1,86	± 0,01	2,66	± 0,15	2,23	± 0,04
INPA F18	1,97	± 0,00	2,00	± 0,00	2,16	± 0,02	2,32	± 0,00	2,57	± 0,03	2,06	± 0,00
INPA F19	2,49	± 0,01	2,39	± 0,02	2,59	± 0,00	2,43	± 0,06	2,24	± 0,00	2,03	± 0,01
INPA F20	1,96	± 0,00	2,23	± 0,02	2,26	± 0,05	1,97	± 0,01	2,05	± 0,04	2,13	± 0,02
INPA F21	1,99	± 0,00	2,01	± 0,00	2,06	± 0,00	2,01	± 0,00	2,00	± 0,01	1,82	± 0,00
INPA F22	1,98	± 0,00	1,96	± 0,01	2,09	± 0,02	2,02	± 0,00	2,20	± 0,02	3,03	± 0,00
INPA F23	1,96	± 0,00	1,85	± 0,00	2,31	± 0,04	2,21	± 0,00	1,95	± 0,02	1,95	± 0,03
INPA F24	1,86	± 0,00	1,96	± 0,00	2,25	± 0,05	2,45	± 0,00	1,79	± 0,01	2,16	± 0,00
INPA F25	1,94	± 0,00	1,85	± 0,00	1,76	± 0,02	1,72	± 0,00	1,97	± 0,06	1,77	± 0,00
INPA F26	1,88	± 0,00	2,01	± 0,01	2,15	± 0,00	2,41	± 0,00	2,23	± 0,04	2,35	± 0,02
INPA F27	1,99	± 0,00	1,96	± 0,00	2,15	± 0,00	2,21	± 0,04	1,88	± 0,00	2,34	± 0,09
INPA F28	2,08	± 0,01	1,86	± 0,01	2,45	± 0,01	2,49	± 0,04	2,08	± 0,05	1,96	± 0,00
INPA F29	2,35	± 0,13	1,88	± 0,00	1,83	± 0,00	1,91	± 0,02	2,18	± 0,00	2,08	± 0,00
INPA F30	1,87	± 0,00	2,12	± 0,04	1,97	± 0,02	2,14	± 0,05	2,10	± 0,01	2,39	± 0,00
INPA F31	2,11	± 0,00	1,84	± 0,00	2,51	± 0,01	1,89	± 0,00	1,96	± 0,04	2,64	± 0,00
INPA F32	1,98	± 0,00	1,96	± 0,01	2,20	± 0,00	1,90	± 0,02	2,14	± 0,06	2,69	± 0,00
INPA F33	1,75	± 0,00	1,83	± 0,00	1,88	± 0,00	1,68	± 0,01	1,69	± 0,01	1,77	± 0,02
INPA F34	1,86	± 0,00	1,94	± 0,00	2,15	± 0,00	2,11	± 0,02	2,18	± 0,05	1,99	± 0,00
INPA F35	2,00	± 0,01	1,94	± 0,03	2,40	± 0,06	1,91	± 0,00	1,81	± 0,00	2,02	± 0,03

INPA F36	2,03	± 0,01	2,00	± 0,00	1,89	± 0,01	2,08	± 0,00	2,52	± 0,00	2,35	± 0,08
INPA F37	1,96	± 0,00	1,89	± 0,00	2,14	± 0,00	1,97	± 0,03	1,85	± 0,00	2,24	± 0,00
INPA F38	1,81	± 0,00	1,83	± 0,00	1,96	± 0,01	1,75	± 0,00	1,73	± 0,01	1,74	± 0,00
INPA F39	1,83	± 0,00	1,91	± 0,00	1,89	± 0,01	2,31	± 0,00	1,98	± 0,00	2,13	± 0,03
INPA F40	2,01	± 0,00	1,97	± 0,00	2,15	± 0,00	2,19	± 0,06	2,35	± 0,02	2,54	± 0,05
INPA F41	2,04	± 0,00	1,96	± 0,00	2,08	± 0,00	1,72	± 0,01	1,96	± 0,05	1,76	± 0,00
INPA F42	2,38	± 0,00	2,19	± 0,00	2,82	± 0,08	2,48	± 0,00	3,16	± 0,06	2,54	± 0,00
INPA F43	2,34	± 0,03	2,03	± 0,00	2,70	± 0,07	3,02	± 0,00	1,97	± 0,00	3,02	± 0,00

ANEXOS

Crescimento de fungos do gênero *Trichoderma* spp. em contato com gasolina

Nadionara Costa Menezes¹, Gabrielle Silva da Costa¹, Francisco Wesen Moreira²,
 Luiz Antonio de Oliveira²

¹ Universidade do Estado do Amazonas

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Emails: nadionaracosta@gmail.com, gaabriellecosta@gmail.com, wesen@inpa.gov.br, luiz.oliveira@inpa.com

Resumo

O impacto ecológico causado por petróleo e seus derivados vem sendo minimizado por diferentes técnicas de remediação, entre elas a biorremediação. A biorremediação usa microorganismos ou suas enzimas para destoxificar ambientes contaminados. Estudos realizados com fungos do gênero *Trichoderma* mostraram que apresentam a habilidade de usarem petróleo como fonte de carbono e, por em sua maioria não serem patogênicos a animais e plantas, apresentam potencial de uso na descontaminação de ambientes contaminados com esse produto e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *Trichoderma* sp. em crescerem em meio contendo a gasolina como fonte de carbono. Para o isolamento dos fungos das amostras de solos, foi utilizada a técnica de diluição seriada até 10^{-3} , em meio de cultura Basal utilizando glicose como fonte de carbono, e após seu crescimento, foram purificados em meio BDA. Com isso foi possível isolar 81 fungos, sendo que 16 pertencem ao gênero *Trichoderma*. Posteriormente, foi analisado o crescimento desses 16 fungos em meio INPA enriquecido com 0,1 mL de gasolina. A quantificação do crescimento se deu pelo peso da biomassa microbiana seca. Todas as 16 linhagens foram capazes de crescer em meio INPA acrescido de gasolina, sendo que os isolados INPA R43 e INPA R48 apresentaram as maiores produções de biomassa, respectivamente 296 e 279 mg.

Palavras-chave: Biodegradação, metabolismo microbiano, hidrocarbonetos.

Introdução

As contaminações de solos e do ambiente hídrico por hidrocarbonetos ocorrem desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo, com a produção de gases poluentes. Tais acidentes têm um grande efeito sobre as propriedades do ambiente contaminado. Observam-se com muita preocupação, os casos de contaminação do solo e água por hidrocarbonetos derivados de petróleo, que mesmo em pequenas concentrações, podem constituir um grande perigo à saúde humana e ao meio ambiente (Souza *et al.* 2010).

Na tentativa de fazer reparo adequado em áreas contaminadas, utiliza-se uma técnica de biorremediação, que compreende o processo de transformação e/ou degradação de compostos tóxicos para torná-lo ecologicamente inofensivo (Jacques, 2010). Esse processo pode envolver o emprego de microorganismos inerentes ao produto contaminante e ao meio ambiente, ou ainda pode lançar mão de microorganismos exógenos (Benriet e Faison, 1997).

O crescimento microbiano e a degradação de contaminantes ocorrem em função do meio ambiente de uma maneira interativa: enquanto crescem e se adaptam ao meio ambiente, os microorganismos o alteram através do consumo de nutrientes e liberação de produtos (Bragato, 2006). Assim, a eficiência da biorremediação é limitada se as condições físico-químicas como temperatura, pH, umidade e disponibilidade de outros nutrientes, além do poluente, o qual representa a fonte de energia, não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microorganismos degradadores, sendo, portanto, necessário um rigoroso controle e definição de parâmetros para aplicação dessa técnica (Boopathy, 2000; Jacques, 2010).

A habilidade de microorganismos como fungos de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diversas fontes de carbono e energia é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade se deve a

produção de uma grande quantidade de enzimas intra e extracelulares, capazes de degradar estes compostos inclusive polímeros complexos (Silva e Esposito, 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por sintetizarem diversos metabólitos secundários, como inibidores de fitopatógenos antimicrobianos, produtores de fitohormônios e enzimas como a celulase e a amilase (Pandey *et al.* 2000; Chandra *et al.* 2009). Estes vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, podendo ser encontrados na rizosfera de plantas, em qualquer tipo de solo com disponibilidade de matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio e em materiais vegetais em decomposição (Harman, 2006; Carreras-Villasenõr *et al.* 2012), sendo colonizadores de sucesso de seus habitats. Esta característica deve-se à sua capacidade degradativa do substrato, que é realizada através de suas enzimas extracelulares (Schuster e Schmoll, 2010), tornando-os de grande interesse econômico.

Por apresentarem essas características e principalmente por raramente serem patogênicos a animais e plantas (Espósito e Silva 1998; Kredics *et al.* 2003; Groll e Walsh, 2001), os fungos *Trichoderma* podem se tornar uma alternativa viável para serem utilizados em processo de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar linhagens fúngicas de *Trichoderma* spp. e, avaliar a capacidade de crescimento das colônias em contato com gasolina.

Material e Métodos

Coleta dos solos

Foram coletadas amostras de solos da Reserva Biológica da Campina, e das Estações Experimentais de Silvicultura Tropical e Fruticultura Tropical do INPA situadas no entorno da cidade de Manaus-AM. As amostras foram acondicionadas em tubos *falcon* estéreis e encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia/INPA.

Isolamento e purificação de *Trichoderma* spp.

Das amostras coletadas foram retiradas 10 g de solo e ressuspensas em 50 mL de água destilada estéril e agitados por 30 minutos a 200 rpm em agitador rotativo. As amostras foram submetidas a uma diluição seriada de até 10^{-3} em solução salina (0,85%). Posteriormente, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram semeadas em triplicata em meio de cultura seletivo para *Trichoderma* em meio Basal utilizando glicose como fonte de carbono (Leelavathi *et al.* 2014). As placas foram incubadas a 30 °C por cinco dias e à medida que as colônias surgiram, foram isoladas e purificadas utilizando-se o meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) nas mesmas condições de cultivo do isolamento.

Avaliação do crescimento de *Trichoderma* spp. em contato com gasolina

Foram selecionados dezesseis fungos que apresentaram características morfológicas semelhantes aos fungos do gênero *Trichoderma*. Um disco de 5 mm de diâmetro da borda de cada micélio do fungo crescido em placas de Petri contendo meio EDA foi inoculado, em triplicata, em papéis de filtro estéreis (0,58 mg) colocados sobre a superfície do meio INPA enriquecido com 0,1 mL de gasolina cedida pelo Laboratório pertencente à Refinaria Isaac Sabbá (REMAN), localizada na cidade de Manaus, Amazonas, com um tratamento controle (papel filtro, gasolina e meio mineral INPA). A gasolina foi filtrada em membrana de 0,22 µm de poro. A incubação foi realizada em temperatura de 15 °C até o momento em que as hifas dos fungos começaram a atingir a borda da placa. Posteriormente, os filtros com as hifas associadas foram secos em estufa a 60 °C por 48 horas e em seguida pesados. Os pesos foram obtidos subtraindo-se o peso do filtro após o crescimento dos fungos (Diniz, 2014).

Análise estatística

Os dados gerados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo teste F. Quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelos testes Skott-Knot, ao nível de 5% de probabilidade (SISVAR).

Resultados e Discussão

Das amostras de solos coletadas de diferentes locais no entorno de Manaus, foram isolados 81 fungos. Esses fungos foram identificados inicialmente como INPA F1 a INPA F81 e estão depositados na Coleção do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia/INPA. Destes, dezesseis linhagens (INPA F2, INPA F4, INPA F12, INPA F18, INPA F23, INPA F29, INPA F31, INPA F40, INPA F41, INPA F43, INPA F44, INPA F46, INPA F48, INPA F50, INPA F52, INPA F58) foram caracterizadas morfológicamente como sendo *Trichoderma*.

Foram observadas diferenças significativas nos valores médios de peso da biomassa dos fungos testados (Figura 1). Os isolados INPA F43 e INPA F48 apresentaram maiores peso da biomassa microbiana seca, com 296 mg e 279 mg, respectivamente. Enquanto que os isolados INPA F41 e F52 não apresentaram valores satisfatória (24 e 13 mg) até o fim do período de avaliação (15 dias). Quando utilizado o meio INPA com a gasolina (Controle), não foi observada crescimento fúngico no papel filtro, confirmando com isso não haver contaminantes presentes no derivado de petróleo.

Nota-se na figura 1, que a maioria dos tratamentos apresentou peso superior a 80 mg, aos 15 dias de incubação, sugerindo com isso que é possível e viável a utilização destes fungos num processo de biorremediação de solos, uma vez que demonstraram adaptação ao meio de cultura e ao derivado de petróleo.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram descritos por Diniz (2014), que ao realizar testes com fungos isolados de amostras de solo contaminado da Antártica, observou que quatro isolados apresentaram peso entre 151,8 e 426,4 mg, em diferentes concentrações de óleo diesel. Hugnes *et al.* (2006), por outro lado, ao avaliarem fungos isolados de solo menos contaminado com hidrocarbonetos, verificaram que os fungos isolados a partir de um solo altamente impactado são menos tolerantes. Para os autores, a tolerância menor dos fungos pode ter ocorrido devido ao enriquecimento do solo com microrganismos que degradam os hidrocarbonetos durante derramamentos anteriores de óleo.

Parr *et al.* (1983) descrevem que a atividade microbiológica no solo é intensamente afetada pela disponibilidade de nutrientes, pela tolerância dos microrganismos às variações do pH, compostos tóxicos, entre outros. Segundo Maciel (2013), fungos filamentosos como o *Penicillium*, são capazes de sobreviver em ambientes com poucos nutrientes e degradar hidrocarbonetos de querosene. Khelifi *et al.* (2009), relatam que ao serem expostos a compostos de estrutura complexa, como a gasolina os microrganismos utilizam uma fonte mais facilmente assimilável para a obtenção de energia, para só então metabolizar as moléculas mais complexas.

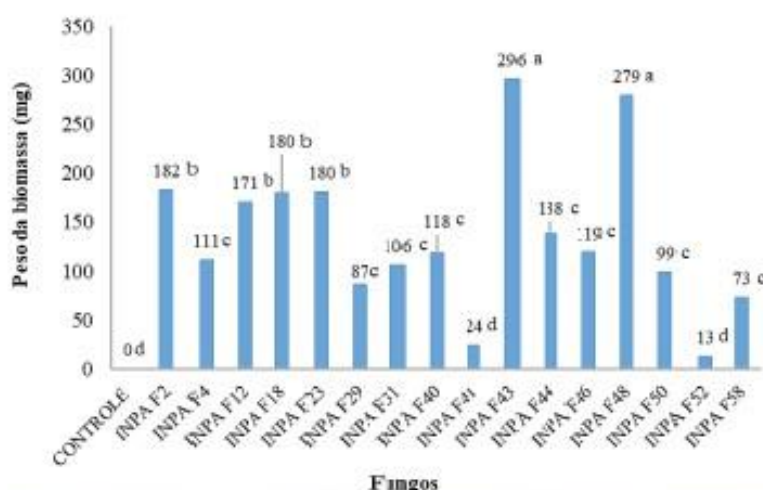


Figura 1. Peso da biomassa microbiana seca das linhagens de *Trichoderma* (mg), crescidas em meio INPA contendo gasolina.

OBS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Conclusões

De um total de 81 isolados de *Trichoderma* da cidade de Manaus, 16 foram capazes de crescer em meio INPA acrescido de gasolina;

Os isolados de *Trichoderma* de maiores pesos de biomassa seca, no período de 15 dias de crescimento foram INPA R43 e INPA R48;

A adição da gasolina ao meio de cultivo não inibiu o crescimento da maioria dos fungos isolados testados. A tolerância e as variações de crescimento na presença da gasolina foram dependentes de cada fungo;

Os testes indicam que esses fungos foram capazes de tolerarem e crescerem na presença de gasolina, indicando com isso potencial uso no processo de biorremediação de solos.

Referências

- Adekunle AA, Adebambo OA 2007. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium senegalense* (J.F. Gmelin) seeds. *Journal of American Science*, 3: 69-76.
- Bennet JW, Faison BD 1997. Use of fungi in Biodegradation. Em: *Manual of Environmental Microbiology* Ed. Christon J. Hurst, J. ASM Press, 758-765.
- Boopathy R 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63.
- Bragato M 2006. *Tratamento 'in-situ' de solo contaminado por derivado de petróleo e metais*. São Paulo, Brasil. (Tese. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. USP).194f.
- Carreras-Villasenor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*, 158: 3-16.
- Chandra M, Kalra A, Sharma PK, Kumar H, Sangwan RS 2009. Cellulase production by six *Trichoderma* spp fermented on medicinal plant process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 605-609.
- Diniz GFD 2014. *Isolamento de fungos de solo da Antártica contaminado com óleo diesel e análise do potencial de crescimento e degradação de hidrocarbonetos*. Sete Lagoas - MG, Brasil (Universidade Federal de São João Del-Rei, UFSJ). 33p.
- Esposito E, Da Silva M 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.*, 24 (2): 89-98.
- Groll AH, Walsh TJ. 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin Microbiol Infect.*, 7 (2): 8-24.
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-196.
- Hugues KA, Bridge P, Clark MS 2006. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 372: 539-548.
- Jacques RJS *et al.* 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas *Ciência Rural*, 40 (2): 310-317. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a468cr1426.pdf>.
- Khelifi E *et al.* 2009. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of Hazardous Materials*, 163: 1056-1062.
- Kredics L *et al.* 2003. Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 37-42.
- Leelavathi MS, Vani LL, Reena P. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3 (1): 96-103.
- Maciel CCS, Souza CS, Silva PA, Sousa MFVR, Gusmão NB 2013. Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *Brazilian Journal of Biosciences*, 1 (11): 39-42.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugar-cane bagasse. *Bioresour Technol.*, 74: 69-80.
- Parr JF, Sikora LJ, Burge WD 1983. Factors affecting the degradation and inactivation of waste constituents in soil. In *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Parr, J.F., Kila, J.M. (eds). Park Ridge, NJ, *Noyes Data Corp.*. 20: 321-337.
- Schuster A, Schmoll M 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3): 787-799.
- Silva M, Esposito E 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: *Educs*, 337-378.
- Souza DB *et al.* 2010. Estudo de micro-organismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. *Revista de Estudos Ambientais*, Blumenau, 12 (2): 38-46.