



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE MICRORGANISMOS  
ISOLADOS DE SEDIMENTOS MARINHOS ANTÁRTICOS**

**LAYSSA DE MELO CARLOS**

Foz do Iguaçu  
2022

**POTENCIAL BIORREMEIADOR DE MICRORGANISMOS  
ISOLADOS DE SEDIMENTOS MARINHOS ANTÁRTICOS**

**LAYSSA DE MELO CARLOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Coorientador: Profa. Dra. Julia Ronzella Ottoni

LAYSSA DE MELO CARLOS

**POTENCIAL BIORREMEIADOR DE MICRORGANISMOS  
ISOLADOS DE SEDIMENTOS MARINHOS ANTÁRTICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biociências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini (UNILA)  
Orientador

---

Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte (UFAL)

---

Dra. Valéria Maia de Oliveira (CPQBA/UNICAMP)

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná 13 de Setembro de 2022.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

C284p

Carlos, Layssa de Melo.

Potencial biorremediador de microrganismos isolados de sedimentos marinhos antárticos / Layssa de Melo Carlos. - Foz do Iguaçu, 2022.

65 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Centro Interdisciplinar de Ciências da Vida, Programa de Pós-graduação em Biociências - PPGBC.

Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

Coorientador: Julia Ronzella Ottoni.

1. Biorremediação. 2. Água - Poluição por petróleo. 3. Solos - Poluição por óleo. 4. Microorganismos - Antártica. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Ottoni, Julia Ronzella. III. Título.

CDU 502.14:665.61

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois Ele me deu tudo o que eu sempre precisei para chegar até aqui, desde a saúde até a disposição para realização de todas as tarefas. Obrigada, Pai!

À minha família, em especial a minha mãe Alda, que sempre me apoiou e incentivou nos estudos desde a minha infância até a fase adulta, ao meu marido Fernando que sempre esteve do meu lado, me apoiando e sendo compreensível com minhas ausências e estresses durante esse período. Ao meu pai Ribamar, minha irmã Layla e sobrinhos Lira e Benjamim, que sempre me ouviam contar minhas pesquisas com atenção e cuidavam de me incentivar a continuar. Muito obrigada!

Ao meu orientador professor Michel Passarini, por mesmo sem me conhecer inicialmente, ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto e por sua constante compreensão e orientação, que ajudaram a tornar mais leve a realização desse curso. Muito obrigada.

À professora Júlia Ottoni, pela co-orientação. Obrigada.

À professora Marcela Boroski pelas orientações nos experimentos laboratoriais químicos, e pela constante disposição em sanar dúvidas, exigindo sempre o melhor com paciência e gentileza.

Aos colegas de laboratório, Karine, Elizandra, Rosane, Gabriela e Suzan, pelas boas conversas e ajuda mútua nos experimentos.

À UNILA, pela realização deste curso e pela bolsa concedida.

Ao MycoAntar e PROANTAR.

CARLOS, Layssa de Melo. **Potencial biorremediador de microrganismos isolados de sedimentos marinhos antárticos**. 65 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

## RESUMO

No processo de extração, transporte e uso do petróleo, podem ocorrer derrames acidentais que contaminam o ambiente terrestre e aquático, prejudicando a fauna e a flora, causando desequilíbrio ecológico e problemas à população humana. A biorremediação tem sido considerada uma alternativa promissora na tentativa de descontaminar ambientes contaminados com compostos derivados do petróleo, pois espécies microbianas sintetizam enzimas que degradam estes compostos. Os microrganismos encontrados na Antártica possuem características peculiares, como sobrevivência em baixas temperaturas e alta exposição à radiação UV. Esta adaptação é suportada pela capacidade destes organismos em sintetizar enzimas e/ou metabólitos diferenciados dos produzidos por microrganismos de ambiente mesofílicos. Assim, os microrganismos antárticos e seus mecanismos de sobrevivência ainda precisam ser investigados de maneira mais efetiva quanto à capacidade de sintetizar compostos que possam auxiliar importantes processos como a biorremediação de ambientes frios contaminados com derivados do petróleo. O objetivo desse estudo foi investigar a capacidade de bactérias e fungos isolados de amostras de sedimento marinho Antártico em sintetizar enzimas e/ou metabólitos capazes de transformar/degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo. Foram isolados 168 microrganismos, 144 bactérias e 24 fungos filamentosos. As bactérias isoladas com enriquecimento e os fungos isolados sem enriquecimento foram submetidos a ensaios de tolerância a compostos derivados do petróleo e potencial produtor de compostos biossurfactantes. Sete isolados bacterianos (10%) apresentaram capacidade de tolerar a presença de óleo diesel (um deles também foi tolerante a gasolina). Dezoito bactérias (26%) e três fungos filamentosos (12,5%) apresentaram capacidade biossurfactante sendo que duas linhagens bacterianas apresentaram mais de 10% de índice de emulsificação. Todos os fungos filamentosos foram submetidos a ensaios de descoloração do corante RBBR, sendo que oito isolados (33,3%) foram capazes de descolorir o corante em meio sólido e dois isolados (8,3%) descoloriram mais de 60% do corante em meio líquido. Os isolados FAR18 (*Cladosporium* sp.), FAD28 (não identificado), BADL15 (não identificado) e BADL17 (*Psychrobacter* sp.) foram os isolados que apresentaram os melhores valores em tolerância ao hidrocarboneto e derivados do petróleo e atividade enzimática. Ensaio de massa seca mostraram que BADL17 (0,05 g.mL<sup>-1</sup>), BADL15 (0,02 g.mL<sup>-1</sup>), FAR18 (0,2 g.mL<sup>-1</sup>) e FAD28 (0,1 g.mL<sup>-1</sup>) foram tolerantes a presença do composto pireno. Os mesmos isolados apresentaram atividade da enzima lacase variando de 0,005U.L<sup>-1</sup> até 0,1 U.L<sup>-1</sup>. Os resultados do presente estudo demonstram o potencial que microrganismos recuperados de amostras marinhas do continente Antártico podem apresentar em processos de biorremediação de ambientes frios contaminados com compostos derivados do petróleo bem como corantes sintético.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Microrganismos Antárticos. Lacase. Biossurfactantes. Pireno.

CARLOS, Layssa de Melo. **Bioremediation potential of microorganisms isolated from Antarctic marine sediments**. 65 pages. Master's thesis of the Graduate program in Biosciences – Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2022.

## ABSTRACT

*In the process of extraction, transport and use of oil, accidental spills can occur that contaminate the terrestrial and aquatic environment, harming the fauna and flora, causing ecological imbalance and problems for the human population. Bioremediation has been considered a promising alternative in an attempt to decontaminate environments contaminated with petroleum-derived compounds, as microbial species synthesize enzymes that degrade these compounds. The microorganisms found in Antarctica have peculiar characteristics, such as survival at low temperatures and high exposure to UV radiation. This adaptation is supported by the ability of these organisms to synthesize enzymes and/or metabolites different from those produced by microorganisms in a mesophilic environment. Thus, the Antarctic microorganisms and their survival mechanisms still need to be investigated more effectively regarding the ability to synthesize compounds that can help important processes such as the bioremediation of cold environments contaminated with petroleum derivatives. The aim of this study was to investigate the ability of bacteria and fungi isolated from Antarctic marine sediment samples to synthesize enzymes and/or metabolites capable of transforming/degrading petroleum-derived hydrocarbons. A total of 168 microorganisms, 144 bacteria and 24 filamentous fungi were isolated. Bacteria isolated with enrichment and fungi isolated without enrichment were submitted to tests of tolerance to petroleum-derived compounds and potential producer of biosurfactant compounds. Seven bacterial (10%) isolates were able to tolerate the presence of diesel oil (one of them was also tolerant to gasoline). Eighteen bacteria (26%) and three filamentous fungi (12,5%) showed biosurfactant capacity and two bacterial strains showed more than 10% of emulsification index. All filamentous fungi were submitted to RBBR dye decolorization assays, and eight isolates (33,3%) were able to decolorize the dye in solid medium and two isolates (8,3%) decolorized more than 60% of the dye in liquid medium. The isolates FAR18 (*Cladosporium* sp.), FAD28 (not identified), BADL15 (not identified) and BADL17 (*Psychrobacter* sp.) were the isolates that presented the best values in tolerance to hydrocarbons and petroleum derivatives and enzyme production. Dry mass assays showed that BADL17 ( $0.05 \text{ g.mL}^{-1}$ ), BADL15 ( $0.02 \text{ g.mL}^{-1}$ ), FAR18 ( $0.2 \text{ g.mL}^{-1}$ ) and FAD28 ( $0.1 \text{ g.mL}^{-1}$ ) were tolerant to the presence of the pyrene compound. The same isolates showed laccase enzyme activity ranging from  $0.005 \text{ U.L}^{-1}$  to  $0.1 \text{ U.L}^{-1}$ . The results of the present study demonstrate the potential that microorganisms recovered from marine samples from the Antarctic continent can present in bioremediation processes of cold environments contaminated with compounds derived from petroleum as well as synthetic dyes.*

**Keywords:** *Bioremediation. Antarctic microorganisms. Laccase. Biosurfactant. Pyrene.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura química dos 16 HPAs incluídos na lista prioritária de agentes poluentes da Agência de Proteção ambiental dos EUA .....	15
<b>Figura 2</b> - Degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por bactérias e fungos aeróbios.....	20
<b>Figura 3</b> - Ilhas Rei George e <i>Deception</i> – Continente antártico.....	28
<b>Figura 4</b> - Proporção de fungos e bactérias isoladas em cada ilha e nas duas etapas de isolamento, com e sem enriquecimento.....	36
<b>Figura 5</b> - Halos de descoloração do corante RBBR em meio sólido.....	39
<b>Figura 6</b> - Descoloração do corante RBBR em meio de cultura líquido por fungos.....	40
<b>Figura 7</b> - Principais resultados do teste colapso da gota por bactérias e fungos.....	41
<b>Figura 8</b> - Principais resultados do teste de emulsificação.....	42
<b>Figura 9</b> - Biomassa celular dos microrganismos na presença do HPA pireno. Os fungos são FAR18 e FAD28 e as bactérias são BADL17 e BADL15.....	46
<b>Figura 10</b> - Produção da enzima lacase dos microrganismos mais eficientes, em três diferentes tempos.....	48
<b>Figura 11</b> - Observação microscópica dos microrganismos FAR18 e BADL17.....	50
<b>Figura 12</b> – Análise filogenética dos microrganismos FAR18 e BADL17.....	51
<b>Figura 13</b> – Observação microscópica dos microrganismos FAR18 e BADL17.....	54
<b>Figura 14</b> – Análise filogenética dos isolados FAR18 e BADL17.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Microrganismos recuperados nas duas etapas de isolamento.....	35
<b>Tabela 2</b> - Formação de halo de descoloração do corante RBBR em meio de cultura sólido por fungos.....	38
<b>Tabela 3</b> - Principais resultados para tolerância a óleo diesel e gasolina, descoloração do corante RBBR e produção de surfactantes e emulsificantes.....	53

## LISTA DE ABREVIações

- ABTS Solução 2,2-azino-bis-etilbentiazolina
- BADL Bactérias isoladas da ilha *Deception* com enriquecimento
- BARL Bactérias isoladas da ilha Rei George com enriquecimento
- FAD Fungos isolados da ilha *Deception* sem enriquecimento
- FAR Fungos isolados da ilha Rei George sem enriquecimento
- GC-MS Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- HPA Hidrocarboneto Policíclico Aromático
- HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência
- MM Meio mínimo
- NA Ágar nutriente
- NB Caldo nutriente
- OPERANTAR Operações Antárticas
- PA Para Análise
- PDA Batata Dextrose Ágar
- PDB Caldo batata dextrose
- R2A Ágar R2
- RBBR *Remazol Brilliant Blue Reactive*
- RPM Rotações por minuto
- TSA Ágar triptona de soja
- TTC *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	<b>Revisão da literatura</b> .....	14
1.1.1	Contaminação ambiental por petróleo e seus derivados.....	14
1.1.2	Antártica: aspectos gerais e presença de petróleo.....	16
1.1.3	Biorremediação microbiana de contaminantes petrolíferos.....	18
1.1.4	Degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	19
1.1.5	Enzimas intracelulares (citocromo P450).....	20
1.1.6	Enzimas extracelulares ligninolíticas .....	21
1.1.7	Produção de biossurfactantes.....	22
1.1.8	Uso de microrganismos antárticos na biorremediação.....	23
1.2	<b>Justificativa</b> .....	25
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
2.1	<b>Objetivos gerais</b> .....	26
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	26
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
3.1	<b>Coleta das amostras</b> .....	27
3.2	<b>Isolamento dos microrganismos</b> .....	27
3.3	<b>Avaliação da descoloração do corante RBBR</b> .....	28
3.3.1	Avaliação da descoloração em meio sólido.....	28
3.3.2	Avaliação da descoloração em meio líquido.....	28
3.3.3	Avaliação da adsorção do corante no micélio fúngico.....	29
3.4	<b>Avaliação da tolerância aos derivados do petróleo</b> .....	30
3.5	<b>Avaliação da produção de biossurfactantes</b> .....	30
3.5.1	Teste inicial colapso da gota.....	31
3.5.2	Teste de emulsificação .....	31
3.6	<b>Avaliação da atividade de lacase</b> .....	31
3.7	<b>Avaliação da tolerância e degradação do hidrocarboneto pireno</b> .....	32
3.7.1	Avaliação da tolerância do hidrocarboneto pireno.....	32
3.7.2	Preparo e condição da cultura para degradação.....	33
3.7.3	Preparação da amostra e análises cromatográficas.....	33

3.8	<b>Caracterização molecular</b> .....	34
3.9	<b>Análise estatística</b> .....	34
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
4.1	<b>Isolamento dos microrganismos</b> .....	35
4.2	<b>Descoloração do corante RBBR</b> .....	38
4.3	<b>Avaliação de composto biossurfactantes</b> .....	41
4.4	<b>Tolerância a derivados do petróleo</b> .....	43
4.5	<b>Avaliação da tolerância ao HPA pireno</b> .....	45
4.6	<b>Avaliação da produção de lacase</b> .....	47
4.7	<b>Avaliação da degradação do pireno</b> .....	49
4.8	<b>Identificação taxonômica</b> .....	54
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
6	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos de ambientes extremos como a Antártica tem sido alvos de estudos científicos, devido as suas características peculiares de sobrevivência em ambientes inóspitos. Proteção contra a alta taxa de radiação ultravioleta, adaptação enzimática ao frio e compostos anticongelantes são algumas das principais características estudadas a partir dos microrganismos da Antártica (LAMILLA *et al*, 2018).

Dentro desse contexto, a capacidade de síntese de enzimas adaptadas ao frio por essas células microbianas tem sido investigada por suas aplicações industriais e em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo. Algumas espécies microbianas apresentam potencial para produzir enzimas que degradam petróleo, utilizando-o como fonte de carbono e reduzindo-o em compostos menos tóxicos (CRUZ & MARSAIOLI, 2012).

Além disso, outras características importantes como a produção de biosurfactantes também são indicativos de potenciais biorremediadores, já que tais metabólitos podem facilitar o acesso das células microbianas na utilização de compostos derivados de petróleo como fontes de carbono (SCHULTZ *et al*, 2022).

O conhecimento de microrganismos que possam atuar na biorremediação precisa ser explorado para otimizar a descontaminação de áreas ambientais afetadas por petróleo e seus derivados, especialmente no ambiente antártico, onde devem ser utilizados apenas microrganismos autóctones. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de microrganismos isolados de sedimentos marinhos coletados no continente Antártico, quanto à produção de compostos aplicáveis a processos de biorremediação incluindo biosurfactantes e enzimas bem como avaliar a tolerância frente a compostos derivados do petróleo.

### 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1.1 Contaminação ambiental por petróleo e seus derivados

O petróleo é uma substância oleosa, inflamável, resultado de condições específicas de pressão e longos períodos de tempo onde a matéria orgânica sofre decomposição, a partir da sobreposição de várias camadas de sedimentos. Sua composição química é formada por uma mistura complexa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), naftênicos e alifáticos associados a oxigênio, nitrogênio e enxofre

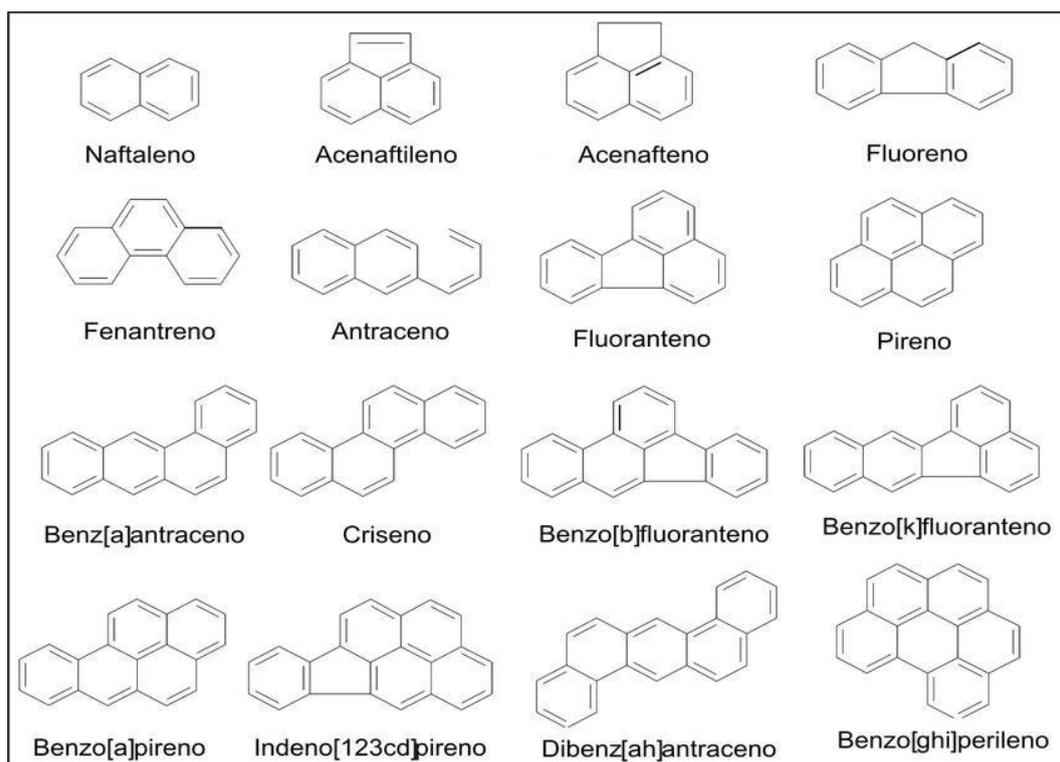
(MARTINS *et al*, 2015).

Muito utilizado para a produção de combustíveis, o petróleo é a base para a produção de gasolina, óleo diesel, lubrificantes e combustíveis para aviação e navegação, além de plásticos, asfalto, tecidos, cosméticos, entre outros compostos (MORAIS FILHO & CORIOLANO, 2016).

Com a larga utilização desses combustíveis na sociedade atual, observa-se que durante o processo de beneficiamento, transporte, armazenamento e uso, ocorrem contaminações do ambiente terrestre e aquático, tais como derramamento de petróleo no ecossistema aquático, contaminação do solo com produtos derivados do petróleo e acidentes com navios cargueiros (MARTINS *et al*, 2015).

Essa contaminação é potencialmente perigosa, principalmente por causa dos HPAs presentes em sua composição. Esses compostos apresentam estrutura cíclica com anel aromático (Figura 1), e normalmente são produtos de combustão incompleta da matéria orgânica, processos industriais ligados ao alumínio e aço e rejeitos sólidos industriais. São altamente tóxicos, mutagênicos, cancerígenos, neurotóxicos e imunotóxicos (NETO *et al*, 2000), constituindo um risco para as pessoas e para o ecossistema. Além disso, possuem alta recalcitrância no ambiente, provocando contaminação por longos períodos de tempo na natureza (FAIZULINA *et al*, 2019).

**Figura 1 – Estrutura química dos 16 HPAs incluídos na lista prioritária de agentes poluentes da Agência de Proteção ambiental dos EUA (MEIRE *et al*, 2007).**



Assim, a contaminação por HPAs pode gerar diversos efeitos negativos na natureza como a destruição de populações de corais, morte de animais aquáticos por asfixia e intoxicação, contaminação de manguezais causando morte de animais nos estágios de vida mais jovens, levando a um desequilíbrio ecológico (JACQUES *et al*, 2007). Esse desequilíbrio ecológico ocorre pois, muitas espécies podem ser afetadas diretamente, acarretando a morte, decorrente do contato direto com o petróleo e indiretamente, quando seu alimento é contaminado ou seu habitat (MOREIRA & ASSIS, 2006).

Um dos maiores desastres ambientais envolvendo contaminação por petróleo no Brasil ocorreu em 2019, no litoral brasileiro, quando manchas de petróleo cru começaram a aparecer no nordeste e se espalharam até o litoral sudeste (PENA *et al*, 2020). Junto com as manchas também surgiram tartarugas, aves marinhas e peixes contaminados com o petróleo em suas narinas, boca e outras partes do corpo, causando asfixia e intoxicação. Alguns desses animais foram resgatados e tratados em centros de pesquisas ambientais, mas uma grande parte morreu decorrente da contaminação (PENA *et al*, 2020). Além disso, recifes de coral foram contaminados, bem como a flora marinha, o que causou um grande dano ecológico, já que esses seres servem como alimento para diversas espécies (MIRANDA *et al*, 2022).

As pesquisas sobre o impacto da contaminação de petróleo nas cadeias alimentares marinhas mostram que os moluscos bivalves, que são filtradores, têm altas taxas de HPAs em seus organismos. Além disso, a presença dos HPAs no ambiente marítimo modifica as características físico-químicas, alterando a turbidez e a quantidade de oxigênio dissolvido (ARAUJO *et al*, 2020). O fitoplâncton é primordialmente afetado pela menor entrada de luz na água, o que diminui sua taxa de fotossíntese, afetando também o zooplâncton, uma vez que, esses organismos se alimentam de fitoplâncton (MARTINS *et al*, 2015).

No solo, a presença de derivados de petróleo impregna as raízes de plantas, impedindo-as de obter água para a produção de energia através da fotossíntese, causando morte das plantas e afetando os animais que se alimentam delas e as tem como habitat (MARTINS *et al*, 2015).

### 1.1.2 Antártica: aspectos gerais e presença de petróleo

A Antártica é um continente localizado no polo sul do planeta, que ocupa aproximadamente 10% da superfície da Terra, é composta de uma grande área continental,

uma área peninsular, e um conjunto de ilhas. Grande parte do continente é permanentemente congelado, por causa das baixas temperaturas, possuindo um clima extremamente seco por causa da baixa pluviosidade (WENTZEL *et al*, 2019).

O continente Antártico possui características extremas que incluem temperaturas entre -20 °C e -50 °C no inverno, e cerca de 0 °C no verão, alta incidência de raios ultravioleta no verão e longos períodos de escuridão no inverno, ciclos de congelamento e derretimento, ventos fortes e altas taxas de evaporação e sublimação (DUARTE *et al*, 2018).

Ao norte do continente Antártico está localizado o arquipélago Shetland do Sul, onde estão as ilhas Rei George e *Deception*. A ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago e está a 130 km a noroeste da península Antártica (WENTZEL, 2017). Nessa ilha estão as estações de pesquisa Antártica de vários países, entre eles Brasil, Argentina, Rússia, Polônia, e outros.

*Deception* é uma ilha vulcânica, onde se encontra um vulcão em atividade, com 7 km de raio. Suas condições incluem glaciação e vulcanismo, criando um ambiente único para estudos científicos (NETO *et al*, 2004). Além disso, a ilha *Deception* recebe cerca de 15.000 turistas por ano e abriga duas estações científicas em seu território (GEYER *et al*, 2019). Por ser um ambiente extremo, muitas vezes na Antártica os ciclos biogeoquímicos são assumidos pelos microrganismos, que estão mais bem distribuídos, inclusive nas regiões mais inóspitas do continente, graças às suas características (MARTORELL *et al*, 2018). Tais formas de vidas microbianas abrigadas no ambiente Antártico têm sido mais amplamente pesquisadas, principalmente para utilização como ferramentas biotecnológicas, por causa de suas adaptações ao habitat extremófilo (LAMILLA *et al*, 2018).

Dentre as utilizações destes microrganismos, a biorremediação tem sido bastante estudada, já que a Antártica tem sofrido com as intervenções humanas, sendo encontrado poluição marinha, introdução de espécies invasoras e contaminação por compostos derivados do petróleo (RIZZO *et al*, 2019; HABIB *et al*, 2018).

Os contaminantes derivados de petróleo chegam através de navios e aviões que acabam contaminando sedimentos e o ecossistema marinho. Outra fonte de contaminação é a geração de energia que é feita através da queima de combustíveis derivados do petróleo, que acidentalmente se derramam no ambiente, atingindo principalmente o entorno da localização dos geradores que são utilizados para gerar energia nas estações de pesquisa na Antártica (ZAKARIA *et al*, 2021).

Na década de 1980, um acidente com derramamento de 20.000 L de óleo diesel ártico (DFA – combustível diesel modificado para evitar que gelifique em condições de clima frio) nas proximidades da estação Antártica brasileira Comandante Ferraz, na ilha Rei George mostra bem a recalcitrância dos componentes químicos do petróleo, com a persistência do cheiro forte do óleo diesel, mesmo depois de mais de 30 anos do ocorrido (JURELEVICIUS *et al*, 2021; DE JESUS *et al*, 2015).

Puasa e colaboradores (2021) mencionaram quatro acidentes com derramamento de derivados de petróleo na Antártica, o primeiro deles aconteceu em 1989, quando o navio Bahia Paraiso sofreu danos e derramou cerca de 510 toneladas de óleo diesel em Arthur Harbour. O segundo foi na região de Cape Hallett, em 2001 e o terceiro em 2007, quando o navio MS *Explorer* derramou petróleo no mar, e o quarto em 2011, com o navio Oliva. O estudo mostra o impacto que os acidentes tiveram na fauna local, especialmente sobre os pinguins que habitavam as áreas.

A contaminação por petróleo também tem sido registrada em outros ambientes polares, como no Ártico, onde as ações antropogênicas no turismo e nas pesquisas científicas, bem como o crescente interesse pela exploração petrolífera na região, principalmente por causa das mudanças climáticas que tem deixado as temperaturas mais amenas, aumentam o risco de derramamentos de petróleo e seus derivados na natureza (VERGEYNST *et al*, 2018). Além disso o acidente com o navio petroleiro Exxon Valdez, em 1989, quando 50 milhões de galões de petróleo foram derramados na região do Ártico, ainda causa prejuízo ao ecossistema, pela difícil remoção da contaminação no ambiente (Verasoundarapandian *et al*, 2021).

A ocorrência de acidentes como esses é agravada pelas condições polares, que envolvem ciclos de congelamento e derretimento, bem como frequentes baixas temperaturas que tornam a contaminação por combustíveis fósseis ainda mais persistente, demorando mais tempo para sofrer decomposição (HABIB *et al*, 2018). Esse cenário contribui para a busca de espécies de bactérias e fungos que sejam capazes de utilizar os HPAs como fonte de carbono e transformá- los em compostos menos tóxicos.

### 1.1.3 Biorremediação microbiana de contaminantes oriundos do petróleo

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados pode ser considerada um desastre ambiental que irá perdurar por longos anos, isso devido à natureza recalcitrante dos componentes químicos encontrados no petróleo, especialmente

os HPAs (FAIZULINA *et al*, 2019). Nesse contexto, a biorremediação aparece como um método eficaz para viabilizar o processo de degradação do petróleo e seus derivados através de agentes biológicos, podendo ocorrer no próprio local da contaminação (*in situ*) ou fora do local de contaminação (*ex situ*) (MORAIS FILHO & CORIOLANO, 2016).

Na biorremediação, os componentes do petróleo são utilizados como fonte de carbono e energia em processos metabólicos de microrganismos e plantas, que degradam tais componentes em produtos menos complexos. Dentre os métodos de remediação de solo usados em contaminação ambiental por petróleo e derivados, a biorremediação tem se mostrado a alternativa mais barata quando comparada com métodos como incineração, oxidação química e aterro (ANDRADE *et al*, 2010).

Além disso, métodos físicos como a extração de vapores do solo, têm como desvantagem que os contaminantes apenas mudam de um lugar para o outro, não deixando de existir, enquanto que a biorremediação consegue transformar os contaminantes potencialmente perigosos em compostos de menor toxicidade (ANDRADE *et al*, 2010).

Um aspecto importante que pode ser encontrado em alguns microrganismos biodegradantes de petróleo é a produção de biosurfactantes. Pesquisas mostram que a presença de biosurfactantes no ambiente contaminado facilita a biodegradação, pois o contaminante passa mais rapidamente da fase orgânica para a fase aquosa, onde normalmente ocorre a degradação, além de solubilizar o contaminante e facilitar a absorção do contaminante pelo microrganismo (ANDRADE *et al*, 2010; JACQUES *et al*, 2007).

#### 1.1.4 Degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A degradação de HPAs pode ocorrer através da volatilização, lixiviação, adsorção (NEVES, 2002), e da ação de elementos físicos como a luz e a temperatura, que desestabilizam sua estrutura química e promovem a quebra das ligações moleculares (JACQUES *et al*, 2007).

A degradação dos HPAs também pode ser feita por microrganismos e outros seres vivos que são tolerantes a essas substâncias e que produzem enzimas (do citocromo P450 e/ou ligninolíticas) capazes de oxidá-las e usá-las como fonte de carbono (KOSHLAFF & BALL, 2017). Essa degradação é chamada de biodegradação.

A biodegradação é a rota mais eficiente de eliminação destes compostos no ambiente natural (NEVES, 2002), produz menos danos ao ambiente (KOSHLAF & BALL,

2017) e pode ser considerada menos dispendiosa quando comparada com outras maneiras de remediação, como a remediação química (CHANDRAN, 2010).

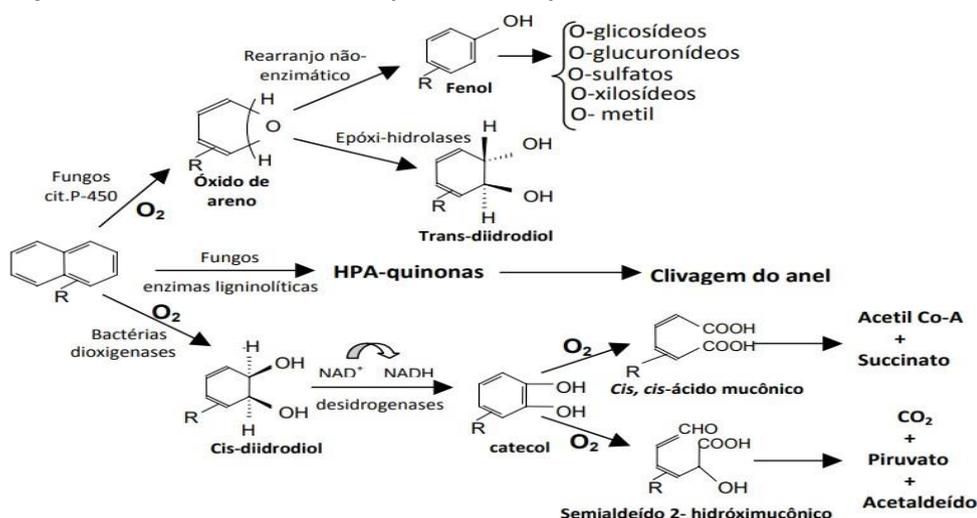
### 1.1.5 Enzimas intracelulares (Citocromo P450)

A capacidade que os microrganismos apresentam na degradação da matéria orgânica é possível graças à produção de enzimas que são capazes de promover a mineralização ou a transformação de produtos contaminantes em compostos menos tóxicos (VASCONCELOS *et al*, 2019).

Dentre essas enzimas estão as intracelulares do citocromo P450, que representam uma superfamília ampla e diversificada de proteínas responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis, que tem em sua composição o grupamento heme, estando presentes em bactérias, archaea e eucariotos (ZANPHORLIN, 2019). O grupamento heme se liga ao oxigênio molecular e possibilita a oxidação do substrato (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009). Nos fungos não-ligninolíticos e nas bactérias, as enzimas intracelulares fazem parte do complexo de enzimas do citocromo P450 e podem degradar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (VASCONCELOS *et al*, 2019).

Essa degradação (Figura 2) ocorre pela oxidação do anel aromático, que é catalisada pela enzima monooxigenase do complexo Citocromo P450, produzindo óxido de areno (MAGRINI, 2012), depois são transformados em *trans*-diidrodióis, através da ação das enzimas epóxido hidrolases, ou podem se transformar em fenol e ter um dos anéis rearranjados dando origem a *o*-glicosídeos ou *o*-glicoronídeos (JACQUES *et al*, 2007).

**Figura 2 – Degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por bactérias e fungos aeróbios pela via do citocromo P450 (SILVA, 2007).**



As bactérias aeróbicas utilizam as dioxigenases para reconhecer o anel aromático, adicionando dois átomos de oxigênio e promovendo a degradação do anel aromático, formando *cis-dihidrodió*, que sofrerá ação de uma desidrogenase e será transformado em um composto dihidroxilado (Figura 2). Depois, outras oxidações possibilitam a abertura do anel aromático e o surgimento de ácido pirúvico, que será usado para a utilização de carbono e energia pelas células microbianas (JACQUES *et al*, 2007; MAGRINI, 2012).

#### 1.1.6 Enzimas extracelulares ligninolíticas

As enzimas ligninolíticas ou ligninases, tem como função primária a degradação da lignina, porém não são específicas, conseguindo assim degradar várias substâncias químicas recalcitrantes, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (MAGRINI, 2012; PASSARINI *et al*, 2011). Essas enzimas degradam a lignina, quebrando suas estruturas aromáticas e as ligações entre suas unidades básicas (Figura 2) (WENTZEL, 2017).

Assim, os fungos e bactérias ligninolíticas produtores dessas enzimas são capazes de degradar vários compostos poluentes e persistentes no ambiente, pois além de sua não especificidade, tais enzimas são extracelulares, o que auxilia na oxidação dos HPAs (MAGRINI, 2012).

Dentre as ligninases, três enzimas têm destaque pela degradação da lignina e pela sua utilização na indústria biotecnológica, especialmente na produção de papel e na produção de medicamentos (WENTZEL, 2017). São elas: manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase.

As lacases podem ser encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos. Elas degradam preferencialmente compostos fenólicos, e são produzidas por grande parte dos fungos, especialmente os chamados fungos da podridão branca (PASSARINI *et al*, 2015). Por não terem especificidade, degradam grande variedade de substâncias poluentes e recalcitrantes, e por isso tem sido largamente estudadas e utilizadas em setores industriais e na biorremediação (PASSARINI *et al*, 2015).

Um exemplo de degradação de hidrocarboneto policíclico aromático por fungo ligninolítico é a rota metabólica do *Pleurotus ostreatus* na degradação do fenantreno, que é oxidado e passa a ser 9,10-fenantreno-quinona e, após clivagem do anel, se transforma em 2,2' difenato. Posteriormente, pode ser formado 2,2' bifenildimetanol ou CO<sub>2</sub> (JACQUES *et al*, 2007) (Figura 2).

As enzimas adaptadas aos ambientes frios possuem maior eficiência catalítica e melhor estabilidade no frio, graças a sua estrutura de conformação proteica, que é mais flexível por ter mais alfa-hélices em sua estrutura secundária, tendo uma interação intra-molecular menos intensa (SILVA *et al*, 2022), assim enzimas como as lacases, podem estar ativas e participar da degradação de HPAs, mesmo no frio intenso, tornando os microrganismos que as produzem, potenciais biorremediadores de contaminações nos ambientes polares.

Além disso, a produção de enzimas como a lacase, pode ser utilizadas em processos biotecnológicos industriais para otimizá-los e torná-los menos dispendiosos.

### 1.1.7 Produção de biosurfactantes

Os surfactantes são substâncias anfifílicas, isto é, com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, que tem a capacidade de reduzir a tensão entre as fases aquosa e orgânica, tornando os compostos alvos biodisponíveis (HANANO *et al*, 2017) (SOUSA, 2016).

A utilização dos surfactantes se aplica a diversas áreas da indústria como petroquímica, alimentícia, cosméticas, entre outras. Além disso, a atuação dos surfactantes é bastante presente nos processos químicos que envolvem a degradação de poluentes oleosos como os derivados de petróleo (XU *et al*, 2018). Os surfactantes podem ser produzidos quimicamente ou biologicamente por microrganismos. Os surfactantes químicos são eficientes em sua função, porém são tóxicos ao ambiente, por terem o petróleo como origem e não serem biodegradáveis (CHAVES, 2017).

Os biosurfactantes são produzidos por microrganismos, animais ou plantas, e possuem baixa toxicidade quando comparados aos surfactantes químicos, além de serem biodegradáveis e com ampla utilização biotecnológica (CHAVES, 2017). Quando produzidos por microrganismos tem como função biológica emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos (ou outra molécula apolar) que antes eram insolúveis, tornando possível sua utilização como fonte de carbono e o crescimento de tais microrganismos (SOUSA, 2016).

A produção de biosurfactantes pelos microrganismos é um bom indicativo de tolerabilidade às substâncias derivadas do petróleo e de capacidade de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SOUSA, 2016).

Em ambientes de frio extremo, como na Antártica, os biosurfactantes desempenham importante papel nos ciclos biogeoquímicos, pois atuam na disponibilização

de compostos pouco solúveis, e viabilizam sua utilização em diferentes estados físicos, tais como gelo, compostos hidrofóbicos e água (RICCARDI *et al*, 2022).

Neste contexto, a busca por moléculas biossurfactantes oriundas do continente Antártico pode se tornar uma alternativa aplicável a processos de biorremediação em ambientes extremos encontrados nas regiões polares.

#### 1.1.8 Uso de microrganismos da Antártica na biorremediação

Os microrganismos da Antártica são adaptados a um habitat que apresenta condições extremas envolvendo baixas temperaturas, alta incidência de luz ultravioleta no verão, baixa incidência de luz solar no inverno, pouca oferta de nutrientes, e sendo resistentes a essas situações de estresse ambiental podem ser utilizados em situações de descontaminação de ambientes frios, se apresentarem potencial biorremediador (ZHANG *et al*, 2020).

Os microrganismos psicrófilos (capazes de crescer em baixas temperaturas) possuem enzimas com conformação proteica flexível, o que possibilita redução de entalpia na ativação e entropia negativa de ativação, quando comparado a microrganismos mesófilos (crescem em temperatura ambiente). Isso quer dizer, que as enzimas desses microrganismos demandam menos energia para sua ativação e suas moléculas se mantêm mais organizadas (DUARTE *et al*, 2018). Além disso, as enzimas de tais microrganismos conseguem catalisar reações químicas, com bom desempenho, mesmo quando expostas a baixas temperaturas (BAWEJA *et al*, 2016).

Características como essas são consideradas um diferencial para a utilização desses microrganismos na biorremediação de regiões frias. Segundo RIZZO *et al* (2019), as baixas temperaturas e o ciclo luminosidade-escuridão podem diminuir as ferramentas abióticas que atuam no processo de degradação de poluentes, e por isso, os microrganismos adaptados a essas condições teriam os elementos necessários para fazer a biodegradação, mesmo em situações adversas.

Além disso, as proteínas das células desses organismos possuem adaptações, como desestabilização do sítio ativo ou da proteína inteira, que permitem o não-congelamento e o funcionamento do sistema catalítico, mesmo em baixas temperaturas (CHAVES, 2017).

Orellana *et al* (2018) mostram em sua pesquisa, que foram encontrados genes de alcano hidroxilases e outras enzimas ligadas a degradação de alcanos de cadeia

longa em bactérias psicrófilas. Isso pode indicar que bactérias de ambiente frio podem ser eficientes na biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Além disso, este estudo também relata que em vários estudos foram encontradas bactérias capazes de degradar petróleo bruto, mesmo em temperaturas abaixo do ponto de congelamento e, na espécie bacteriana *Oleispira antarctica*, foi encontrados uma diversidade de genes de degradação de alcanos, e um conjunto de proteínas que funciona como uma barreira térmica protegendo a reação de hidroxilase dos efeitos negativos das baixas temperaturas.

Outro aspecto importante a ser considerado é que o ambiente Antártico tem sido cada vez mais atingido por poluentes antrópicos, inclusive por derivados de petróleo, e para o desenvolvimento de técnicas de biorremediação em ambientes polares, o uso de microrganismos nativos da Antártica é o mais viável (ORELLANA *et al*, 2018).

Pesquisas realizadas na Antártica mostram a existência de espécies nativas com capacidade de degradação de hidrocarbonetos como naftaleno e fenantreno e crescimento expressivo em áreas fortemente contaminadas com HPAs (VAZQUEZ *et al*, 2017; GRAN-SCHEUCH *et al*, 2017).

Um estudo de LAMILLA *et al* (2018), demonstrou que a linhagem *Streptomyces* sp. SO 3.2, isolada de solo Antártico (próximo a bases científicas e militares) foi capaz de produzir biossurfactantes, o que torna viável seu uso para biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros compostos derivados do petróleo. Ademais, estudos anteriores também mostraram que outras espécies de microrganismos antárticos são produtores de biossurfactantes, tais como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, e a levedura *Candida antarctica* (LAMILLA *et al*, 2018).

A produção de enzimas de aplicação biotecnológica por microrganismos Antárticos tem sido reportada em estudos como o de MARTORELL *et al* (2017), onde leveduras foram isoladas de diferentes pontos de solo Antártico, incluindo áreas próximas a tanques de combustíveis derivados de petróleo, e foi verificado crescimento da espécie *Pichia caribbica* em meio contendo hidrocarbonetos bem como produção de biossurfactantes (JOSHI-NAVARO *et al*, 2014).

Isso indica que tais microrganismos podem ter potencial para biorremediação em áreas contaminadas por derivados de petróleo por sua tolerância a esses compostos e pela síntese de enzimas ligadas a degradação de HPAs. Outros estudos demonstraram a produção de lacase e lignina peroxidase por fungos isolados de solo Antártico (WENTZEL *et al*, 2017) e a produção de ligninase por bactérias de pontos diversos

do ambiente Antártico (LOPERENA *et al*, 2012).

A existência de microrganismos com potencial para biorremediação de contaminantes derivados de petróleo no continente Antártico, tem sido descrita na literatura, porém os estudos realizados ainda são escassos, sendo necessário mais estudos, em especial sobre as enzimas e biossurfactantes envolvidos no processo de biodegradação em ambientes frios.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A utilização do petróleo e seus subprodutos para produção de combustíveis e derivados ocasiona acidentes ambientais em todas as áreas do planeta, inclusive nos ambientes polares. A contaminação por substâncias derivadas do petróleo tem sido encarada com preocupação, por causa da recalcitrância dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que compõem essas substâncias, que são consideradas neurotóxicas, carcinogênicas, teratogênicas, dentre outras complicações da saúde humana e animal.

Dentro desse contexto, os microrganismos polares tem sido estudados por sua capacidade de produzir enzimas e moléculas com potencial biotecnológico, com eficiência mesmo em condições extremas de baixas temperaturas, escassez hídrica, alta salinidade e pouca matéria orgânica.

Dessa forma, as pesquisas envolvendo o potencial biorremediador de microrganismos Antárticos tem importância crucial, dada a eficiência desse método e a necessidade da utilização de organismos nativos de regiões polares para esse fim.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biorremediador de microrganismos isolados de sedimentos marinhos antárticos, coletados das Ilhas Rei George e *Deception*, através de ensaios de tolerância a presença de hidrocarbonetos aromáticos bem como avaliar a atividade da enzima lacase e de compostos biossurfactantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

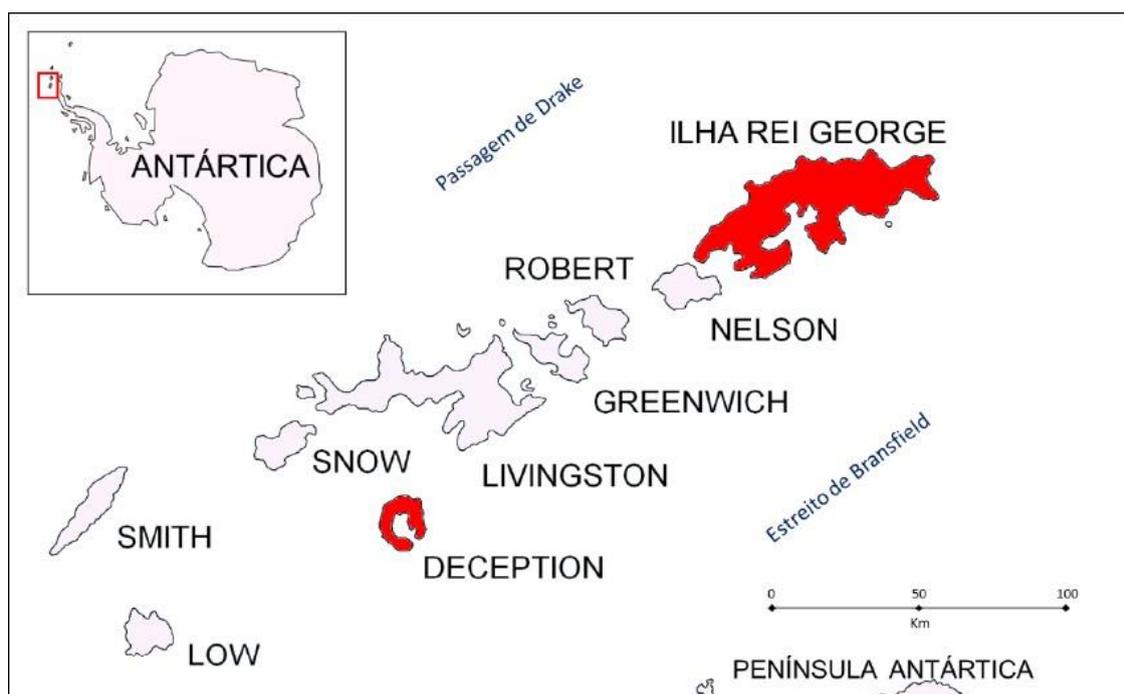
- Isolar fungos e bactérias de sedimentos marinhos das ilhas antárticas Rei George e *Deception*.
- Selecionar dentre os isolados fúngicos e bacterianos espécies tolerantes a derivados do petróleo através do crescimento na presença de gasolina, óleo diesel e corantes; e também:
  - Verificar a produção de biossurfactantes.
  - Investigar a produção da enzima lacase.
  - Investigar a degradação do composto pireno.
  - Identificar por ferramentas moleculares as espécies com potencial biorremediador.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de sedimento marinho foram coletadas na Ilha Rei George (Baia do Almirantado, em frente a tanques de combustível da Estação Antártica Comandante Ferraz -  $62^{\circ}05'025''$ ;  $058^{\circ}22'628''$ ) e Ilha *Deception* (*Whalers Bay* -  $S 62^{\circ} 58' 52,0''$ ;  $W 60^{\circ} 39' 52,9''$ ) (Figura 3), na logística adotada pelo Programa Antártico Brasileiro durante a expedição OPERANTAR XXXVII (verão 2018/2019). A coleta da amostra da Ilha Rei George foi realizada no dia 05 de dezembro de 2018, em uma profundidade aproximada de 48 metros. A coleta da amostra da Ilha *Deception* foi realizada no dia 04 de dezembro de 2018 a 95,4 metros de profundidade.

**Figura 3 – Ilhas de amostragem do sedimento marinho Rei George e *Deception* no Continente antártico**



Fonte: PEREIRA, 2015.

#### 3.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento dos microrganismos foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi preparada uma solução com 10 g do sedimento marinho de cada ilha e 50 mL de água peptonada 0,5%, incubada por 7 dias a  $15^{\circ}\text{C}$ . Na segunda etapa, o isolamento foi realizado a partir de uma solução de 100 mL de água contendo peptona (5%), gasolina (10%), óleo

diesel (10%), glicose (0,5%) e 10 g de sedimento de cada ilha separadamente, incubada por 7 dias a 15 °C.

Nas duas etapas, os microrganismos foram isolados nos meios de cultura Ágar Batata Dextrose – PDA (10 g L<sup>-1</sup> de glucose, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar em 1000 mL de infusão de batata, sendo adicionado 500 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol), Ágar Nutriente – NA (3 g L<sup>-1</sup> de extrato de carne, 5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo adicionado 100.000 U L<sup>-1</sup> de nistatina) e R2A (0,5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,5 g L<sup>-1</sup> de peptona, 0,5 g L<sup>-1</sup> de hidrolisado de caseína, 0,5 g L<sup>-1</sup> de glucose, 0,3 g L<sup>-1</sup> piruvato de sódio, 0,5 g L<sup>-1</sup> de amido, 0,3 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio, 0,025 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar em pH 7), acrescido de cloranfenicol (para isolamento de fungos) e nistatina (para isolamento de bactérias) em quantidades iguais as descritas anteriormente na composição dos meios PDA e NA. As placas foram acondicionadas a 15 °C por 15 dias. As colônias foram purificadas e p reservadas a -80 °C em 20% de glicerol.

Os isolamentos foram realizados em duplicata para cada amostra e para cada diluição (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>). Para pesquisa de fungos, o isolamento foi realizado sem diluição e na diluição 10<sup>-1</sup> e para pesquisa de bactérias, nas diluições 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RBBR

#### 3.3.1 Descoloração em meio sólido

Os fungos filamentosos foram inoculados (três discos de micélio de aproximadamente 0.5 cm de diâmetro) em placas de Petri contendo o meio de cultivo PDA e duas concentrações do corante RBBR separadamente (500 mg.L<sup>-1</sup> e 1000 mg.L<sup>-1</sup>), sendo incubados a 15 °C por 14 dias. A formação de halos de descoloração ao redor de cada colônia microbiana, foi considerado resultado positivo (BERNAL *et al*, 2021).

#### 3.3.2 Descoloração em meio líquido

Os fungos filamentosos que apresentaram halo de descoloração em meio sólido foram selecionados para o teste de descoloração em meio líquido. A descoloração do corante RBBR em meio de cultura líquido foi realizada de acordo com Da silva *et al*. (2008), com modificação. Três discos miceliais de cada fungo foram cultivados em meio mínimo durante 7 dias, sob agitação de 150 rpm à 15 °C. Ao meio de cultivo foi acrescido o corante RBBR na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 1 mL das culturas foram coletadas e centrifugadas a 12.000

rpm por 2 minutos e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorvância em relação ao tempo zero, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA *et al.*, 2008). A eficiência da descoloração foi expressa através da fórmula:

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{A_{\lambda \text{ inicial}} - A_{\lambda \text{ final}}}{A_{\lambda \text{ inicial}}} \times 100$$

$A_{\lambda \text{ inicial}}$  = absorvância inicial e  $A_{\lambda \text{ final}}$  = absorvância final

Experimentos de controle foram conduzidos utilizando meio mínimo, com inóculo, isento de RBBR (branco) e meio mínimo isento de células com adição de RBBR. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Os isolados que apresentaram 60% ou mais de descoloração foram avaliados quanto à capacidade de produção da enzima lacase.

### 3.3.3 Avaliação de adsorção do RBBR ao micélio fúngico

Os isolados fúngicos que descoloriram o corante em mais de 60% foram submetidos ao teste de adsorção do corante ao micélio. Assim, os isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura mínimo com adição de RBBR na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>. Os frascos foram incubados em estufa rotatória durante 7 dias, sob agitação de 150 rpm à 15 °C.

Alíquotas de 1 mL das culturas foram coletadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorvância em relação ao tempo zero, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA *et al.*, 2008).

As culturas foram trituradas utilizando o sistema Ultra – Turrax segundo Passarini *et al.* (2011). As amostras permaneceram em repouso até separação das fases sólidas - líquidas. Alíquotas da fase líquida foram coletas com auxílio de uma micropipeta, centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante diluído 10 vezes com água destilada. A partir dessas diluições foi verificada a redução da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm (DA SILVA *et al.*, 2008). A absorvância antes da trituração e após trituração foram comparadas para verificar a possibilidade de adsorção do corante RBBR no micélio.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA A DERIVADOS DO PETRÓLEO

Todos os isolados foram avaliados quanto à tolerância aos compostos óleo diesel e gasolina de acordo com RIBEIRO *et al.* (2016), com modificação. Os compostos foram incorporados ao meio de cultura Meio Mínimo (MM) ( $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ,  $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,7 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaNO}_3$  em tubos de ensaio nas proporções de 3,2 mL de MM acrescidos de óleo diesel e gasolina (20%), separadamente. Os isolados (fungos e bactérias) foram inoculados aos tubos e foram incubados em estufa rotatória a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação de 150 rpm, por 14 dias. O experimento foi conduzido em triplicata. Para o controle os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 800 microlitros de meio de cultura (PDB: Infusão de batata  $4 \text{ g L}^{-1}$ , dextrose  $20 \text{ g L}^{-1}$  e NB:  $3 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de carne,  $5 \text{ g L}^{-1}$  de peptona) e 3,2 mL de MM. Foram considerados tolerantes os isolados que apresentaram absorvância maior ou igual ao controle.

Os considerados tolerantes foram submetidos ao teste de viabilidade celular de acordo com a metodologia desenvolvida por BROWN *et al.* (2013) modificado. Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de 96 poços contendo 200  $\mu\text{L}$  de meio líquido MM na presença de 20  $\mu\text{L}$  de óleo diesel e gasolina, separadamente. Os isolados bacterianos tiveram densidade ótica ajustada para 0,08 a 0,10 nm antes do cultivo. Os isolados fúngicos foram cultivados em tubos de ensaio, contendo 3,2 mL de meio líquido MM e 800  $\mu\text{L}$  de óleo diesel e gasolina, separadamente. Depois do crescimento, 220  $\mu\text{L}$  dos extratos fúngicos foram transferidos para uma placa de 96 poços. Após 7 dias (bactérias) e 14 dias (fungos) de crescimento a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , foi adicionado em cada poço 20  $\mu\text{L}$  de TTC (Cloreto de trifetil tetrazólio) 0,5% a fim de revelar a atividade de crescimento microbiano através da mudança de cor do meio de crescimento para púrpura. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (450 nm). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

#### 3.5.1 Teste inicial do colapso da gota

Os ensaios da verificação da capacidade produtora de biosurfactantes foram realizados com todos os isolados utilizando o teste de Colapso da Gota (BODOUR *et al.*, 2003). Para isso os isolados foram cultivados em meio de cultura líquidos PDB ou NB a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  por 14 e 5 dias, para fungos e bactérias respectivamente. Os ensaios foram realizados

em tampas das placas de 96 poços (TPP®). Para cada poço da tampa, foi aplicada uma camada de óleo de motor automotivo. As tampas foram mantidas estáticas durante 24 h a 25 °C. Após este período, alíquotas de 7 µL (~1 gota) do meio de cultura + 2 µL de azul de metileno foram adicionadas no centro de cada poço que continha o óleo de motor. O teste foi considerado negativo quando a gota (sobrenadante), adicionada em cima do óleo, permaneceu intacta ou positivo, quando a gota se espalhou ou colapsou. Os testes foram realizados em triplicatas. Os meios sem inóculo foram utilizados como controle negativo e uma solução de Tween 2 % foi utilizada como controle positivo.

### 3.5.2 Teste de emulsificação (Teste E24)

O ensaio de emulsificação (Teste E24) consistiu na formação de uma camada de emulsão entre o extrato enzimático e o óleo comercial. A avaliação da atividade emulsificante (E24) foi realizada de acordo com os métodos descritos por Cooper & Goldenberg (1987) e Fleck *et al.* (2000). Os isolados foram cultivados em 5 mL de meio mineral de cultivo (extrato de levedura 5 g mL<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g L<sup>-1</sup>; NaCl 2.7 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.6 g L<sup>-1</sup>; óleo de soja 1 % v/v) por 7 (bactérias) e 14 (fungos) dias a 15 °C sob agitação de 150 RPM. As culturas foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 min, 4 °C. Em seguida, 2 mL de cada extrato foi transferido para tubos de rosca contendo 2 mL de óleo diesel. Os tubos foram agitados em vórtex na máxima velocidade por 2 minutos. As medidas ocorreram após 24 h. O índice de emulsificação (E24) foi calculado pela medida da altura da camada de emulsificação, dividido pela altura total da cultura, multiplicado por 10. Solução de Triton 2% foi utilizada como controle positivo e o meio mineral sem o inóculo foi utilizado como controle negativo.

## 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

Os isolados fúngicos que apresentaram 60% ou mais de descoloração do corante RBBR e os isolados bacterianos com melhores resultados na tolerância a óleo diesel foram selecionados para os ensaios de produção da enzima lacase. Os microrganismos foram cultivados em Erlenmeyers contendo 50 mL dos meios (concentração 50%) PDB para fungos por 7, 14 e 21 dias e NB para bactérias por 5, 10 e 14 dias, a 15 °C, em triplicata. O extrato enzimático (1.800 µL) foi adicionado a uma mistura de 900 µL de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 300 µL de solução 2,2-azino-bis-

etilbentiazolina (ABTS). A partir dessa mistura foi verificada a absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm, em seguida, incubada por 10 minutos a 15 °C, e novamente verificada a absorvância no mesmo comprimento de onda.

A atividade da lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) de acordo com BUSWELL; CAI; CHANG (1995), medida por monitorização do aumento da absorvância. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol ABTS por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar de 36000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (E<sub>420</sub>= 3.6 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) (BOURBONNAIS; PAICE, 1988).

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{(t) (E) (V_s)}$$

Quando:

U = Atividade da enzima (µmol min<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>)

ΔA = Absorvância final – Absorvância inicial)

V<sub>t</sub> = Volume total da reação (mL)

10<sup>6</sup> = fator de correção (µmol mol<sup>-1</sup>)

t = tempo da reação (min)

E = coeficiente de extinção molar (L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

V<sub>s</sub> = Volume da amostra

### 3.7 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA E DEGRADAÇÃO DO HIDROCARBONETO PIRENO

#### 3.7.1 Avaliação de tolerância ao hidrocarboneto pireno

Os isolados fúngicos que apresentaram 60% ou mais de descoloração do corante RBBR e os isolados bacterianos com melhores resultados no ensaio de tolerância ao óleo diesel e gasolina foram submetidos aos testes de tolerância ao pireno. Os isolados foram cultivados em Erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL dos meios PDB (fungos) NB

(bactéria) em 3 períodos de tempos: 5, 10 e 14 dias para bactérias e 7, 14 e 21 dias para fungos, sob agitação de 150 RPM a 15°C, em triplicata.

Para o teste de tolerância ao pireno, o extrato fermentativo de cada Erlenmeyer foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL sendo centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Depois, 15 mL desse sobrenadante foi retirado para a avaliação da atividade enzimática de lacase. Nos cultivos de bactérias, o restante do sobrenadante foi desprezado e o tubo com *pellet* foi reservado. Nos cultivos de fungos, o restante do sobrenadante foi filtrado com o auxílio de papel filtro e aparelho de bomba a vácuo, onde o micélio ficou retido no papel filtro. O *pellet* bacteriano e o micélio no papel filtro foram mantidos em estufa de secagem a 70 °C por 72 horas. Depois da secagem, foram pesados em balança analítica para obtenção de peso seco da biomassa celular bacteriana e fúngica. Os tubos Falcon e o papel filtro utilizados foram pesados antes e após a secagem.

### 3.7.2 Preparação e condição da cultura para degradação

Os isolados com melhor potencial biorremediador foram cultivados em meio de cultivo específico para bactérias (NB) e/ou fungos (PDA). As bactérias tiveram densidade óptica ajustada para 0,08 a 0,10 nm e no caso dos fungos, três discos miceliais foram retirados e transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo Batata Dextrose (PDB). Os frascos foram incubados em estufa rotatória a 15 °C sob agitação de 150 rpm por 24 h. Depois de 24 h, foram adicionados 2 mg de pireno (dissolvido em 0,5 mL de dimetilsulfóxido, analiticamente) e incubados novamente a 15 °C sob agitação de 150 rpm, durante 7 dias para bactérias e 14 dias para fungos, no escuro. O experimento foi realizado em triplicata. O controle (inóculo sem pireno) foi incubado seguindo as mesmas condições das culturas com pireno. Outros dois frascos (tempo zero) contendo os meios PDB e NB, os discos de micélio, inóculo bacteriano, separadamente, e pireno não foram incubados, e seguiram para o procedimento de extração (PASSARINI *et al.*, 2011).

### 3.7.3 Preparação da amostra (Extração do Hidrocarboneto) e análises cromatográficas

A extração do hidrocarboneto e seus produtos de degradação em meio de cultivo foram realizados usando um sistema de trituração Ultra-Turrax, segundo PASSARINI *et al.*, (2011). Cerca de 50 mL de acetato de etila (PA), foram adicionados em funil de separação juntamente com o meio fermentativo sendo colocados em triturador

(Polytron). O procedimento foi realizado em triplicata. À fase orgânica foi adicionado 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para desidratação da amostra. O material foi submetido a secagem e suspenso em 2 mL de acetato de etila (grau HPLC). A partir dessa solução, 50 µL foram dispensados em balão volumétrico com adição de 4.950 µL de acetato de etila (grau HPLC). Essa solução foi submetida a análises em GC-MS para avaliação da degradação do composto pireno e detecção da formação de seus metabólitos.

### 3.8 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS PROMISSORES

A identificação molecular dos isolados com potencial biotecnológico foi realizada pela empresa GoGenetics, localizada na cidade de Curitiba. Neste sentido, o DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com protocolos utilizados na empresa. Os ensaios de amplificação foram realizados com *primers* para a região espaçadora intergênica (ITS) de fungos e para o gene RNA ribossomal 16S de bactérias. Os amplificados foram sequenciados em um sequenciador automático. As sequências derivadas do sequenciamento foram comparadas com sequências depositadas em bases de dados de acesso público Genbank ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) usando o programa BLASTn. As sequências foram alinhadas utilizando o programa BioEdit e as análises evolutivas foram realizadas usando o programa MEGA X com o modelo de Kimura (KIMURA, 1980). A construção filogenética foi realizada com o algoritmo neighbor-joining (NJ) (BERNAL *et al*, 2021).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas com os testes ANOVA e Turkey (5% de significância) com o programa BioStat 5.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Foram isolados 22 fungos filamentosos e 75 bactérias da etapa de isolamento sem enriquecimento e 69 bactérias e 2 fungos filamentosos da etapa de isolamento com enriquecimento (Tabela 1).

Os fungos isolados sem enriquecimento foram identificados com as siglas FAD (da ilha *Deception*) e FAR (da ilha Rei George) e as bactérias isoladas com enriquecimento foram identificadas com BADL (da ilha *Deception*) e BARL (da ilha Rei George).

Cerca de 80% das bactérias isoladas cresceram no meio de cultivo NA e 70% dos fungos cresceram no meio de cultivo PDA, sendo estes meio de cultivo os que tiveram maior número de microrganismos recuperados.

**Tabela 1 – Microrganismos recuperados nas duas etapas de isolamento (com e sem enriquecimento) dos sedimentos marinhos das ilhas Rei George e *Deception*. Fonte: a própria autora.**

Isolamento						
Sem enriquecimento				Com enriquecimento		
	Rei George	<i>Deception</i>	Total	Rei George	<i>Deception</i>	Total
<b>Fungos filamentosos</b>	08	14	22	02	0	02
<b>Bactérias</b>	29	46	75	17	52	69

Apesar de numericamente haver mais isolados da ilha *Deception*, é possível observar a mesma porcentagem de isolados fúngicos e bacterianos em ambas as ilhas, no isolamento sem enriquecimento (figura 4). Isso indica o potencial das duas ilhas em abrigar possíveis microrganismos biorremediadores de petróleo (JURELEVICIUS *et al*, 2012), visto sua exposição a atuação antrópica, com a utilização de combustíveis para produção de energia em estações de pesquisa, na ilha Rei George e a presença de cinzas vulcânicas contendo HPAs, na ilha *Deception* (WONG *et al*, 2021).

O isolamento de microrganismos nessas duas ilhas Antárticas também foi demonstrado nos estudos de Santos *et al.* (2020), que isolaram 309 fungos filamentosos de amostras de solo da região de *Collins Glacier*, na ilha Rei George, Silva *et al* (2018) que isolaram 109 bactérias do sedimento marinho de 10 pontos das ilhas *Southland* do sul, inclusive as ilhas Rei George e *Deception*, Nóbrega *et al* (2021) isolaram 1000 linhagens bacterianas de 6 amostras de solo da ilha *Deception* e Wentzel *et al* (2019) que isolaram 24

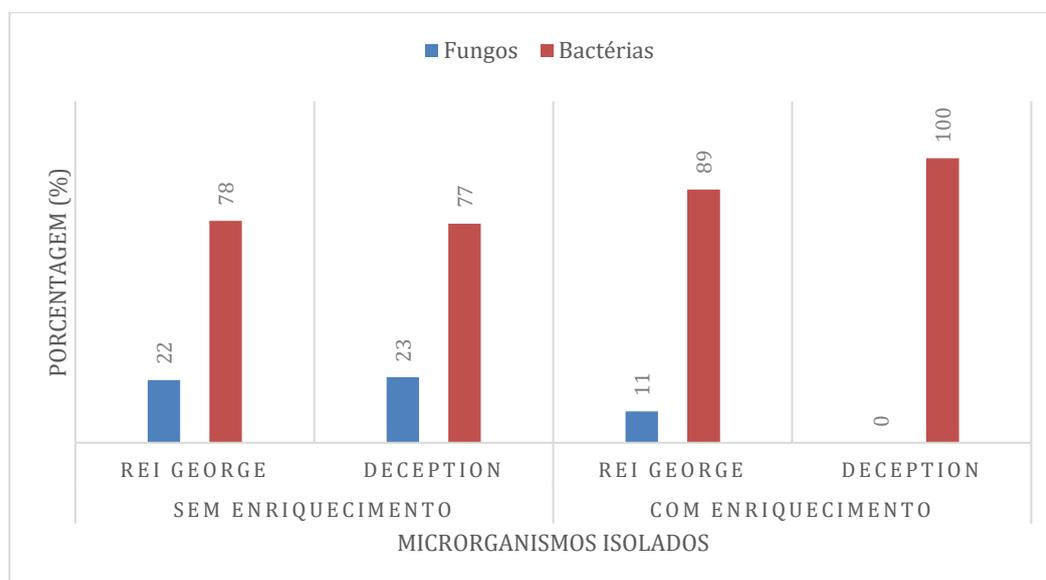
fungos filamentosos e 146 leveduras de seis amostras de sedimento marinho da ilha Rei George, e 399 leveduras e 492 fungos filamentosos de amostras de solo.

No presente estudo, foram isolados 24 fungos filamentosos (sem enriquecimento), sendo 8 da ilha Rei George e 16 da ilha *Deception*. A menor quantidade de fungos isolados pode ser explicada pela localização da amostra na ilha Rei George, próxima ao tanque de combustível da Estação Antártica Brasileira, como observado no estudo de Martorell *et al* (2018), onde foram isolados 51 fungos de distintas áreas da ilha Rei George, e foi verificado que solos com pouca oferta de matéria orgânica e contaminados com derivados do petróleo tiveram menos isolados que amostras de solo associadas a líquens, musgos e dejetos de pinguins.

Curiosamente, o isolamento com enriquecimento recuperou apenas 2 fungos da ilha Rei George e nenhum fungo da ilha *Deception*. Considerando que fungos Antárticos tem apresentado tolerância e capacidade de degradação de óleo diesel (FERRARI *et al*, 2011; WONG *et al*, 2021), talvez o ponto de coleta, onde a amostra foi extraída não abrigue espécies tolerantes ao diesel e fungos com essa capacidade possam ser recuperados em outros pontos das ilhas.

Outro aspecto importante é que em amostras de sedimento marinho, em geral um número menor de microorganismos é recuperado, como é possível notar nos estudos de Wentzel *et al* (2019) com 24 fungos filamentosos isolados de sedimento marinho e 492 fungos filamentosos de amostras do solo, ambos da ilha Rei George.

**Figura 4 – Proporção de fungos e bactérias (%) isoladas em cada ilha e nas duas etapas de isolamento, com e sem enriquecimento. Fonte: a própria autora.**



A maioria dos microrganismos foi recuperada em meio de cultivo ricos em nutrientes (PDA e NA), o que favorece o isolamento de maior diversidade de bactérias e fungos de crescimento rápido (AHN *et al*, 2019). Resultado semelhante foi observado no estudo de Ferrari *et al*. (2011), onde espécies fúngicas de solos Antárticos foram melhor recuperados em meios de cultivos muito nutritivos, como TSA, PDA ou NA. Porém, o uso de meios de cultivo como R2A, com poucos nutrientes, favorece a recuperação de microrganismos de crescimento lento (FERRES *et al*, 2015) e aumentando a possibilidade de recuperação de espécies menos abundantes (RAAD *et al*, 2021).

A técnica de isolamento microbiano utilizando o enriquecimento pode facilitar o isolamento de microrganismos tolerantes, porém sem a capacidade de degradação, como demonstra o estudo de Chang *et al* (2016), em que um isolamento feito com pré-enriquecimento de 10 HPAs resultou em linhagens bacterianas sem capacidade de degradação dos hidrocarbonetos. Além disso, como observado no estudo de Chang *et al* (2016) que deixou as culturas enriquecidas por 6 meses antes de recuperar os microrganismos, caso o período de incubação (do presente estudo) fosse aumentado durante o isolamento com enriquecimento, talvez fosse recuperado um número de microrganismos mais próximo do número de tolerantes reais a óleo diesel.

Ademais, o isolamento com enriquecimento se mostrou hábil para recuperar bactérias tolerantes a óleo diesel e gasolina, e o fato de terem sido recuperados poucos fungos (apenas 2) no isolamento com enriquecimento, mostra que o enriquecimento teve certa eficiência, pois posteriormente testes de tolerância aos derivados de petróleo mostraram que os fungos recuperados no isolamento sem enriquecimento não se mostraram tolerantes a óleo diesel.

O presente estudo mostrou mais microrganismos isolados da ilha *Deception* (112 fungos e bactérias) do que da ilha Rei George (56 fungos e bactérias), isso talvez seja explicado por causa da ação antropogênica na ilha *Deception* ao longo do tempo: com histórico de navios baleeiros que atracavam na região entre os anos 1912 e 1932, e depois a construção de bases militares e científicas, hoje desativadas por causa da atividade vulcânica, atualmente a ilha recebe navios trazendo turistas todos os anos (CENTURION *et al*, 2019), além disso as cinzas vulcânicas presentes no ambiente da ilha também pode explicar a existência de microrganismos com atividade biorremediadora em contaminação por HPAs (SANTOS *et al*, 2022).

Essa ação antropogênica expõe o ambiente a diversos compostos que funcionam como fonte de carbono para os microrganismos da região, aumentando não só

a riqueza de espécies tolerantes e/ou degradadores de HPAs (em relação a áreas não impactadas ou menos impactadas) como também a variedade de tolerância e resistência a elementos como metais pesados, biocidas e hidrocarbonetos, como foi relatado no estudo de CENTURION *et al.* (2022), em que a análise metagenômica revelou que a diversidade microbiana foi mais elevada nas áreas impactadas da ilha *Deception*. No estudo de Martorell *et al.* (2018), 93% dos fungos foram isolados de áreas mais ricas em matéria orgânica e áreas impactadas por combustíveis usados na obtenção de energia e apenas 8% foi isolado de áreas mais preservadas, na ilha Rei George.

Apesar de a ilha Rei George abrigar estações científicas e por isso, também sofrer com a ação humana, a exposição mais prolongada da ilha *Deception* a essa ação favorece mais a existência de microrganismos adaptados e, portanto capazes de tolerar e/ou degradar compostos como os hidrocarbonetos.

#### 4.2 DESCOLORAÇÃO DO CORANTE RBBR

O corante RBBR possui compostos aromáticos, em sua estrutura química, assemelhando-se aos HPAs, conhecidos componentes de substâncias derivadas do petróleo, por isso a capacidade de descoloração tem sido usada como maneira de triagem para potenciais biorremediadores (DA SILVA *et al.*, 2008).

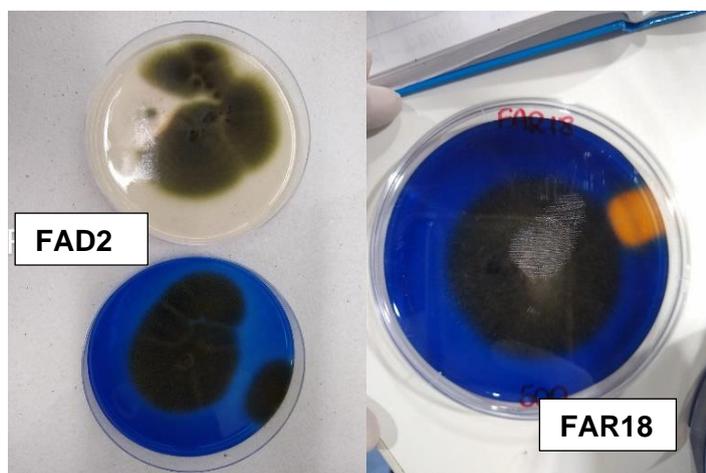
Dos 24 fungos filamentosos isolados, oito foram capazes de formar halo (33,3% dos fungos) de descoloração discreto em meio sólido com adição do corante RBBR (Tabela 2 e Figura 5).

**Tabela 2 – Fungos filamentosos formadores de halo de descoloração do corante RBBR em meio de cultivo sólido. Fonte: a própria autora.**

<b>Código dos isolados</b>	<b>Halo 500 mg.L<sup>-1</sup> (cm)</b>	<b>Halo 1000 mg.L<sup>-1</sup> (cm)</b>
<b>FAR18</b>	0,3	0,3
<b>FAR22</b>	0,2	0,2
<b>FAD23</b>	0,5	0,4
<b>FAD24</b>	0,1	-
<b>FAD29</b>	0,5	0,4
<b>FAD28</b>	0,2	0,2
<b>FAR21</b>	0,4	-
<b>FAD27</b>	0,5	0,5

Os oito fungos que demonstraram algum halo de descoloração (e mais um fungo isolado com enriquecimento) foram submetidos a teste de descoloração de RBBR em meio líquido.

**Figura 5 – Formação de halos discretos de descoloração do corante RBBR em meio sólido (PDA + corante RBBR) por fungos filamentosos. Fonte: a própria autora.**



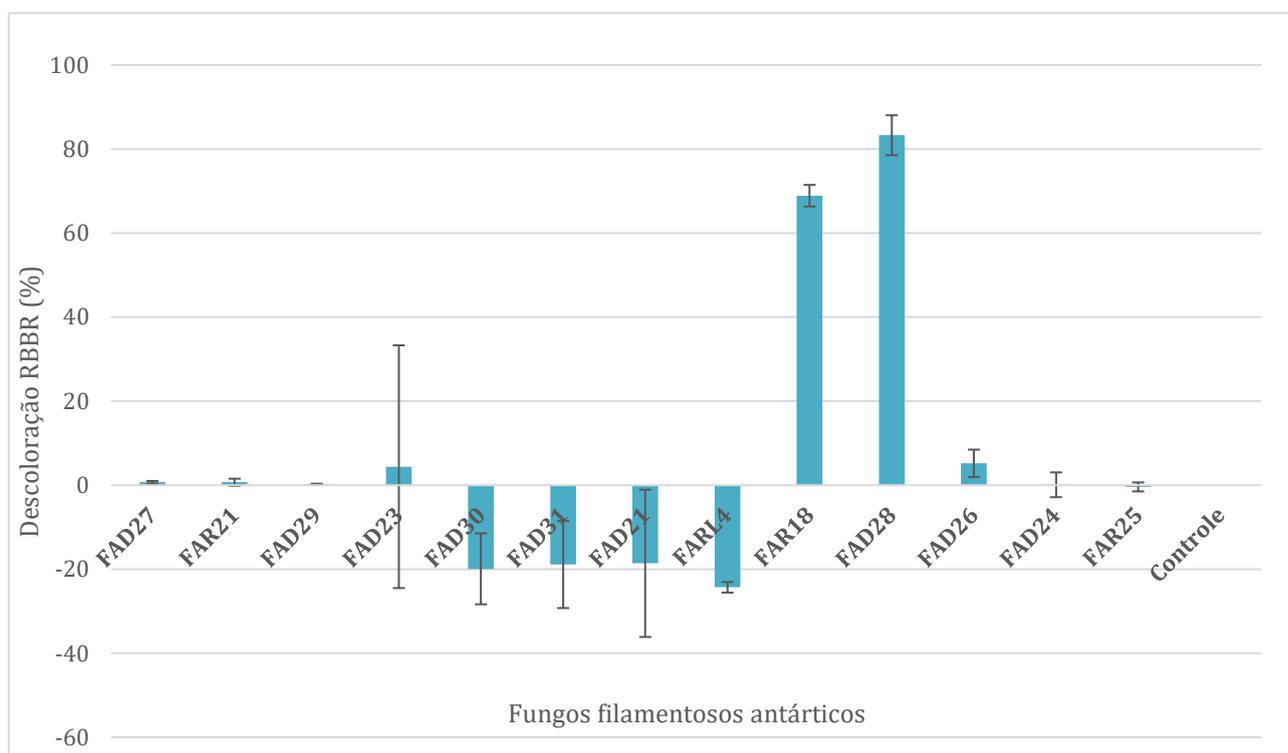
Dois isolados fúngicos FAR18 e FAD28 apresentaram descoloração de mais de 60%, conforme Figura 6. Além disso, FAR18 e FAD28 foram submetidos a ensaios de adsorção do RBBR ao micélio fúngico, ensaios que demonstraram a capacidade de adsorção do corante de 6,5% e 18,4% , respectivamente.

A biossorção de corantes e substâncias poluentes é uma das maneiras de detoxificar contaminantes, em que as células microbianas englobam esses compostos em grupos funcionais dentro das células, onde sofrerão processos químicos como troca iônica e formação de complexos (VIEIRA *et al*, 2021).

A capacidade de descoloração de corantes como o RBBR pode indicar produção de enzimas ligninolíticas como a lacase, uma vez que o corante RBBR tem em sua composição HPAs semelhantes aos encontrados na lignina, e tal enzima por ser inespecífica pode atuar como importante viabilizadora da degradação de outros HPAs (ROVATI *et al*, 2013).

Por isso, a capacidade de descoloração de corantes tem sido usada como método de triagem de fungos com potencial biorremediador de áreas contaminadas com HPAs, como degradação de hidrocarbonetos (CHANG *et al*, 2016) e produção de enzimas ligninolíticas (KITA *et al*, 2022).

**Figura 6 – Fungos capazes de descolorir o corante RBBR em meio de cultivo líquido (MM + corante RBBR) e Controle (MM + Malte). Fonte: a própria autora.**



No gráfico, é possível observar resultados negativos, que talvez possam ser explicados pelo fato de os fungos produzirem pigmentos que deixaram o meio de cultivo depois dos dias de incubação, com maior absorvância que o próprio controle (MM+fungo, sem corante).

Leveduras Antárticas tem se mostrado hábeis em descolorir corantes, no estudo de Rovati *et al* (2013) 33% das leveduras isoladas da ilha Rei George apresentaram descoloração de quatro corantes (Vilmafix® Blue RR-BB, Vilmafix® Red 7B-HE, Vilmafix® Black B-V e Vilmafix® Yellow 4R-HE) e no estudo de Ruscasso *et al* (2022) três leveduras isoladas da ilha Rei George, *Leucosporidium muscorum* F20A, *Candida sake* 41E e *Cystoflobasidium infrmominatum* F13E demonstraram capacidade de descolorir o corante RB-5.

Poucos estudos utilizando fungos filamentosos isolados da Antártica com capacidade em descolorir corantes já foram descritos. Quatro linhagens de fungos filamentosos isolados da região Terra Nova Bay na Antártica, sendo um deles do gênero *Penicillium*, foram capazes de descolorir o corante RBBR e hábeis para degradar hidrocarbonetos (CHANG *et al*, 2016). Por outro lado, outras duas linhagens de fungos filamentosos da espécie *Penicillium cf. oxalicum*, isolados da ilha *Deception* demonstraram

habilidade em descolorir o corante Sulphur Indig Blue (KITA *et al*, 2022). Desta forma, o presente trabalho demonstra ainda mais o potencial em descolorir corantes por fungos filamentosos isolados do continente antártico.

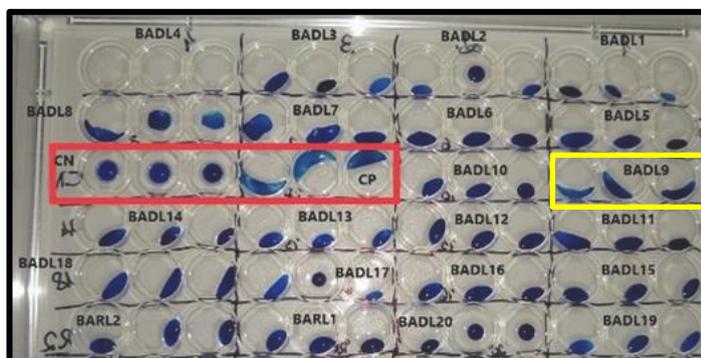
#### 4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOSURFACTANTES

A presença de surfactantes pode aumentar a viabilidade de degradação de hidrocarbonetos por microrganismos, em situações de biorremediação (CORONEL-LEON *et al*, 2015) e a utilização de poluentes hidrofóbicos como fonte de carbono (MALAVENDA *et al*, 2015).

As 69 bactérias e os 24 fungos filamentosos isolados foram submetidos ao teste do colapso da gota, em que 18 bactérias (duas da ilha Rei George e 16 da *Deception*, 26% das bactérias analisadas) e 3 fungos filamentosos (todos da ilha *Deception*, 12,5% dos fungos analisados) mostraram potencial atividade biosurfactante (Figura 7).

**Figura 7 – Principais resultados do teste Colapso da gota para bactérias e fungos.**

Fonte: a própria autora.



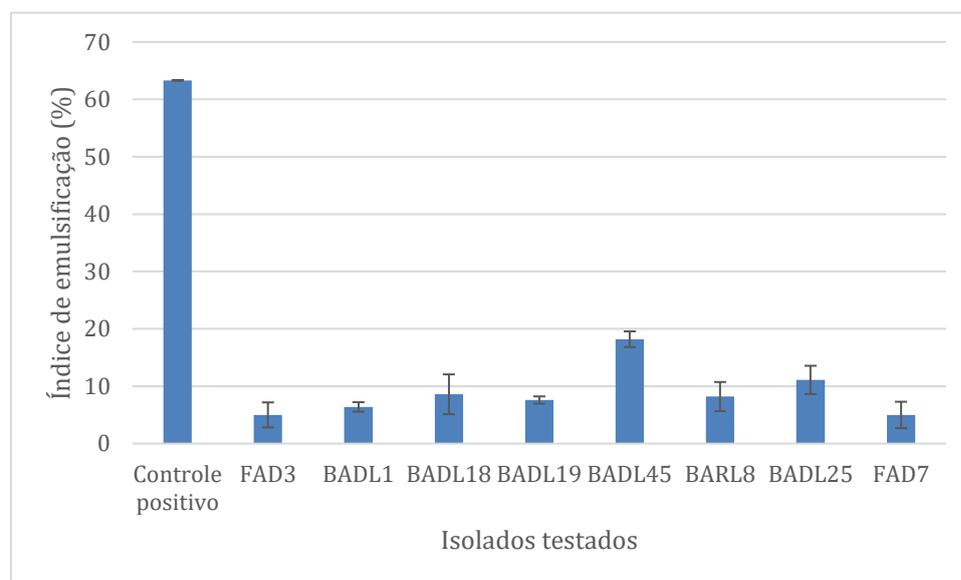
**Legenda: Em destaque vermelho, os controles positivo (CP) e negativo (CN). Em destaque amarelo, exemplo de resultado positivo.**

Estudos mostram bactérias polares produtoras de biosurfactantes bem como capacidade de emulsificação, incluindo espécies dos gêneros *Rhodococcus* isoladas da península Byer na Antártica, com 60% de índice de emulsificação (MALAVENDA *et al*, 2015), *Bacillus licheniformis* AL 1.1, isolada da ilha *Deception* apresentando capacidade de redução da tensão superficial da água e índice de emulsificação em diferentes fontes de carbono (CORONEL-LEON *et al*, 2015), e 13 linhagens bacterianas dos gêneros *Geobacillus*, *Anoxybacillus* e *Brevibacillus*, isoladas da ilha *Deception* com índice de emulsificação de mais 50% e resultado positivo no teste colapso da gota (SCULTZ *et al*,

2022).

As bactérias e fungos que apresentaram resultados positivos no ensaio do colapso da gota, foram submetidas ao teste de emulsificação. Seis bactérias e dois fungos apresentaram taxas de emulsificação potenciais para uso em processos ambientais, com destaque para duas bactérias (BADL45 e BADL25) que apresentaram  $E_{24}$  maior que 10% de emulsificação (Figura 8).

**Figura 8 – Principais resultados do teste de emulsificação ( $E_{24}$ ) de óleo diesel (índice de emulsificação acima de 5%). Fonte: a própria autora.**



Uma linhagem bacteriana do gênero *Rhodococcus* isolada de solo da ilha Rei George apresentou alto índice de emulsificação (91%), além de atividade tensoativa (IBRAHIM *et al*, 2020).

No presente estudo, as bactérias com potencial atividade biossurfactante apresentaram uma baixa capacidade de emulsificação em óleo diesel. Talvez a realização de estudos posteriores com diferentes fontes de carbono (outros hidrocarbonetos) e diferentes temperaturas possam fornecer condições que possibilitem produção de biossurfactantes otimizada (MALAVENDA *et al*, 2015) (TRUDGEON *et al*, 2020).

De todos os isolados bacterianos que apresentaram resultados positivos no ensaio do colapso da gota, apenas o isolado BADL17 também foi capaz de tolerar o composto óleo diesel. No presente estudo, BADL17 foi identificada como pertencente ao gênero *Psychrobacter*, o qual tem sido isolado de amostras do continente Antártico, sendo um gênero já associado como promissor produtor de compostos biossurfactantes, tendo

resultado positivo no colapso da gota (STYCZYNSKI *et al*, 2022), com índice de emulsificação de 70% (RICCARDI *et al*, 2022), e com tolerância a óleo diesel e petróleo cru (TRUDGEON *et al*, 2020).

Estudos com fungos antárticos produtores de biossurfactantes mostraram 11 linhagens de leveduras, isoladas de solos das ilhas Rei George e *Deception*, com resultado positivo para o teste colapso da gota e índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) maior que 10%, com destaque para a espécie *Candida glabrosa*, que teve o melhor desempenho dentre as 11 linhagens (BUENO *et al*, 2019) e *Moesziomyces antarcticus*, isolada do lago Vanda, na Antártica, conhecida pela produção de enzimas extracelulares e de biossurfactantes glicolipídicos (PERFUMO, BANAT e MARCHANT, 2018).

Assim, estudos posteriores devem ser dirigidos a fim de elucidar outras características desses biossurfactantes, incluindo a caracterização estrutural bem como situações de produção ótima para fins biotecnológicos, e também para ampliação do conhecimento de seu potencial biorremediador, através de testes com diferentes poluentes derivados do petróleo (GRAN-SCHEUCH *et al*, 2017).

#### 4.4 TOLERÂNCIA A DERIVADOS DO PETRÓLEO

Os testes de avaliação de tolerância a óleo diesel e gasolina (20%) mostraram que das 69 bactérias isoladas, sete foram tolerantes a óleo diesel (10% das bactérias analisadas), sendo uma delas, também tolerante a gasolina. Nenhum fungo se mostrou tolerante a óleo diesel ou gasolina. Estudos com microrganismos Antárticos relatam tolerância a óleo diesel em bactérias (DE JESUS *et*, 2021; ZAKARIA *et al*, 2021; WONG *et al*, 2021) com mais frequência do que em fungos, apesar disso fungos filamentosos e leveduras têm apresentado tolerância e capacidade de degradação de HPAs, componentes de derivados do petróleo (WONG *et al*, 2021). No estudo de Ferrari *et al* (2011), fungos dos gêneros *Exophiala*, *Arthroderma* e *Penicillium* isolados de solo sub-antártico mostraram crescimento na presença de óleo diesel SAB (Diesel alternativo de mistura especial antártica), porém linhagens do gênero *Cladosporium* sp., mesmo gênero do fungo FAR18 do presente estudo, não apresentaram tolerância a óleo diesel (WONG *et al*, 2021).

Uma linhagem bacteriana do gênero *Arthrobacter* (isolada da ilha Rei George) apresentou tolerância e capacidade de degradar óleo diesel (56,45%) (ABDULRASHEED *et al*, 2020). O estudo de Wang *et al* (2014) mostrou a habilidade das

linhagens bacterianas antárticas *Planococcus* sp. NJ41 e *Shewanella* sp. NJ49 para degradar óleo diesel em baixas temperaturas, e a linhagem bacteriana *Rhodococcus* sp. AQ5-07 (isolada da ilha Rei George) demonstrou capacidade de usar óleo diesel como fonte de carbono, mineralizando 57,63% dos hidrocarbonetos constituintes do diesel (ROSLEE *et al*, 2020).

O isolado BADL17, identificado como pertencente ao gênero *Psychrobacter* sp., conseguiu crescer na presença de óleo diesel, indicando tolerância a esse composto. Resultado semelhante foi observado no estudo de Rizzo *et al* (2020), em que duas linhagens bacterianas do gênero *Psychrobacter* sp., isoladas de solos da Antártica continental também cresceram na presença de óleo diesel, utilizando este composto como única fonte de carbono.

No presente estudo, dentre as bactérias tolerantes a óleo diesel cinco foram isoladas da ilha *Deception* e duas da ilha Rei George. A ilha *Deception* apresenta alta atividade antropogênica desde o século XIX, quando era visitada por navios baleeiros até a atualidade, onde é considerada destino turístico recebendo navios e visitantes, bem como pesquisadores (CENTURION *et al*, 2022). Além disso, a ilha conta com a presença de cinzas vulcânicas, que tem em sua composição HPAs (SANTOS *et al*, 2022). Toda essa movimentação contribui para o aumento de acúmulo orgânico no ambiente, inclusive HPAs, o que ocasiona diversidade microbiana (CENTURION *et al*, 2022), e os HPAs das cinzas resultantes da atividade vulcânica da ilha podem explicar a existência de microrganismos com habilidades como a tolerância de hidrocarbonetos, e isso é observado nos resultados deste estudo, com 98 bactérias isoladas dessa ilha e cinco tolerantes a óleo diesel. Além disso, o isolado bacteriano BADL15 apresentou tolerância a gasolina, configurando uma habilidade possivelmente encontrada pela primeira vez em microrganismos Antárticos.

A ilha Rei George também apresenta alta atividade humana, devido as estações de pesquisa científica em seu território. Essa região tem registros de contaminação com petróleo, pelo contato frequente com os combustíveis dos geradores de energia das estações, e pelo acidente na década de 1980, que contaminou o solo com óleo diesel (JURELEVICIUS *et al*, 2022). Assim, o ambiente da ilha impôs condições que resultaram na seleção de microrganismos tolerantes e/ou degradadores de compostos derivados do petróleo, permitindo a sua sobrevivência a existência de microrganismos tolerantes e degradadores de compostos derivados do petróleo, como observado neste estudo, com duas bactérias isoladas desta ilha tolerantes ao óleo diesel.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO HPA PIRENO

Duas linhagens bacterianas (BADL15 e BADL17) com melhores resultados na tolerância a óleo diesel e os dois fungos (FAR18 e FAD28) com melhor capacidade de descoloração do corante RBBR foram submetidos a testes de tolerância ao hidrocarboneto pireno.

As duas bactérias tolerantes ao pireno também foram tolerantes ao óleo diesel. Semelhantemente a isso, 53 bactérias isoladas do solo da ilha Rei George (contaminado com diesel) se mostraram capazes de metabolizar o hidrocarboneto fenantreno (GRAN-SCHEUCH *et al*, 2020) e três linhagens bacterianas, *Rhodococcus erythropolis*, *Sphingobium xenophagum* e *Pseudomonas guineae*, capazes de degradar fenantreno (GRAN-SCHEUCH *et al*, 2017)

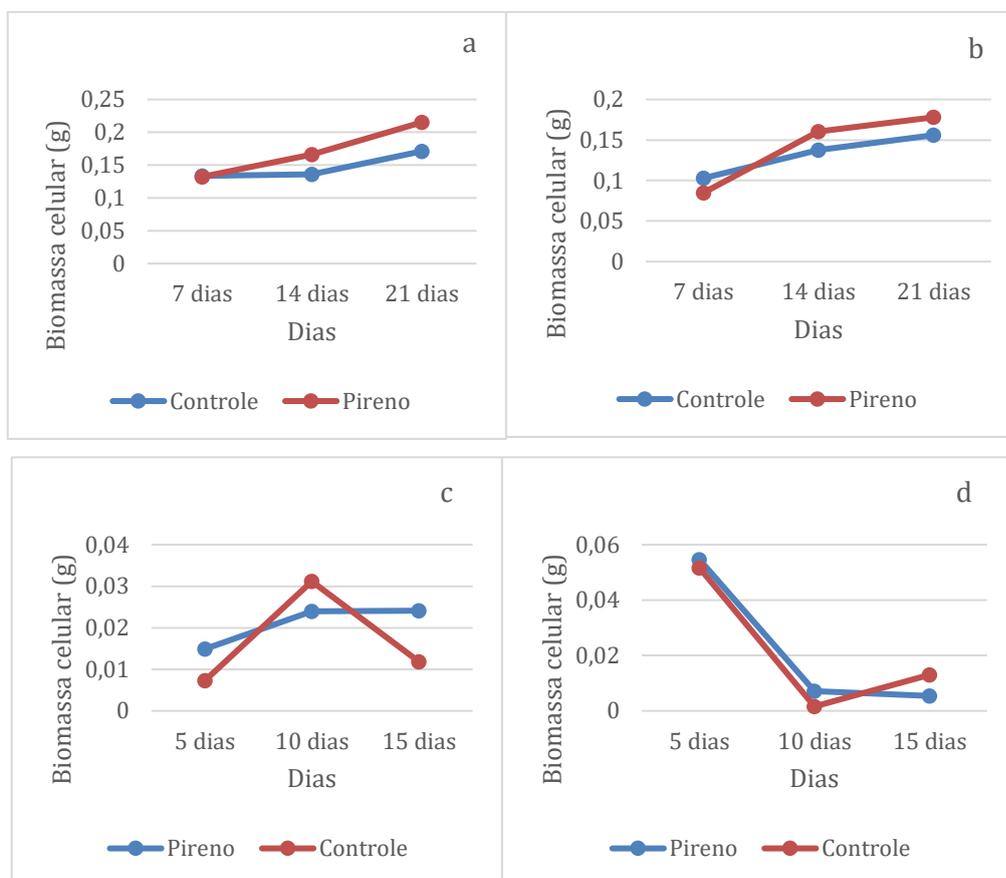
A capacidade de tolerância e crescimento bacteriano na presença de pireno e outros hidrocarbonetos de alta toxicidade (em ambientes frios) tem sido relatada em estudos, como o de ERIKSON, DALHAMMAR & MOHN (2002), em que bactérias isoladas do Ártico, do gênero *Pseudomonas*, foram capazes de formar biofilme sobre cristais de pireno. No estudo de JURULEVICIUS *et al*. (2012) foi demonstrado a presença dos genes *alkB*, responsáveis pela produção da enzima alcano monooxigenase, que viabiliza a degradação de alcanos por bactérias dos gêneros *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* e *Aeromicrobium*, isolados da ilha Rei George.

Rizzo *et al*. (2020) isolaram linhagens bacterianas de vários gêneros, dentre eles *Psychrobacter* sp., com capacidade de crescimento na presença de hidrocarbonetos como fenantreno e tolueno, como únicas fontes de carbono. Yumoto *et al*. (2020) identificaram uma nova espécie bacteriana, *Dietzia psychralcaliphila*, psicrotolerante, com a habilidade de crescer na presença de alcanos, e utilizá-los com fonte de carbono de maneira facultativa.

Os quatro microrganismos se mostraram tolerantes ao pireno, sendo que FAR18 e BADL17 tiveram resultados um pouco mais expressivos (0,21 g e 0,03 g) em biomassa celular, ou mais uniformes, com maior crescimento na presença do pireno (Figura 11). Porém, os quatro microrganismos apresentaram maior biomassa na presença de pireno, em algum momento do cultivo.

Os fungos FAR18 e FAD28 tiveram maior biomassa celular na presença do pireno, no 14° dia e no 21° dia de crescimento. E a bactéria BADL17 apresentou maior biomassa na presença do pireno no 5° dia e no 10° dia de crescimento, enquanto BADL15 teve maior biomassa no 5° dia de crescimento (Figura 9).

**Figura 9 – Biomassa celular dos microrganismos na presença do HPA pireno, cultivados por 7, 14 e 21 dias (fungos) e por 5, 10 e 15 dias (bactérias), a 15° C e 150 RPM. Fonte: a própria autora.**



**Legenda: (a) FAR18, (b) FAD28, (c) BADL17, (d) BADL15. Desvio padrão +/- 0,05.**

Para serem capazes de protagonizar ações biorremediadoras em áreas polares, os microrganismos precisam apresentar algumas características para sobreviver ao ambiente inóspito dos pólos terrestres, tais como a tolerância ao frio extremo, sobrevivência a dessecação e tolerância ao congelamento (PANICKER *et al*, 2002).

Nesse sentido, bactérias do gênero *Psychrobacter*, como BADL17, tem sido relatada como psicrotolerante podendo crescer em temperaturas psicrofílicas a mesofílicas (-10 °C a 30 °C) (BAKERMANS *et al*, 2006), além de terem sido isoladas de diversas regiões do ambiente Antártico como solo ornitogênico, gelo, sedimento marinho, solo e gelo oceânico (BOWMAN *et al*, 1996). Sendo também capazes de produzir proteínas que induzem ao escape de água do meio intracelular, protegendo a bactéria do congelamento (MOREIRA *et al*, 2022).

No estudo realizado por KRUCON e colaboradores (2021), os autores demonstraram tolerância de três linhagens bacterianas isoladas da ilha Rei George,

pertencente ao gênero *Psychrobacter*, ao hidrocarboneto n-hexadecano e ao óleo diesel, bem como produção da enzima lacase em meio sólido suplementado com guaiacol e produção de biossurfactantes.

Poucos estudos tem investigado o potencial biorremediador dos fungos filamentosos Antárticos. Fungos do gênero *Mollisia* e *Trichoderma* isolados de solo Antártico, demonstraram tolerância ao hidrocarboneto dodecano, tendo crescimento igual ao controle (sem hidrocarboneto) e aumentando o crescimento quando o hidrocarboneto foi adicionado (*Mollisia* sp.) (HUGHES, BRIDGES e CLARK, 2007). Fungos do gênero *Penicillium*, isolados de solo Antártico, demonstraram tolerância e alta capacidade de degradação do hidrocarboneto decano (49%) e baixa degradação do HPA benzo[a]pireno (2%) (GOVARTHANAN *et al*, 2017).

A existência de microrganismos tolerantes a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na ilha *Deception* foi observada por Santos *et al* (2022), que fizeram um estudo metagenômico no solo da ilha *Deception* e mostraram um alto índice de genes ligados a tolerância a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, provavelmente ligados a presença de cinzas vulcânicas, que abrigam grandes quantidades de HPAs (SANTOS *et al*, 2022).

Assim, a presença de microrganismos tolerantes a HPAs demonstrado no presente estudo, reforça a importância de se explorar ambientes extremos como o Antártico, na busca por células microbianas potencialmente transformadoras de derivados do petróleo, aptas a serem aplicadas em processos de biorremediação de compostos derivados do petróleo, contaminantes de ambientes frios.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE

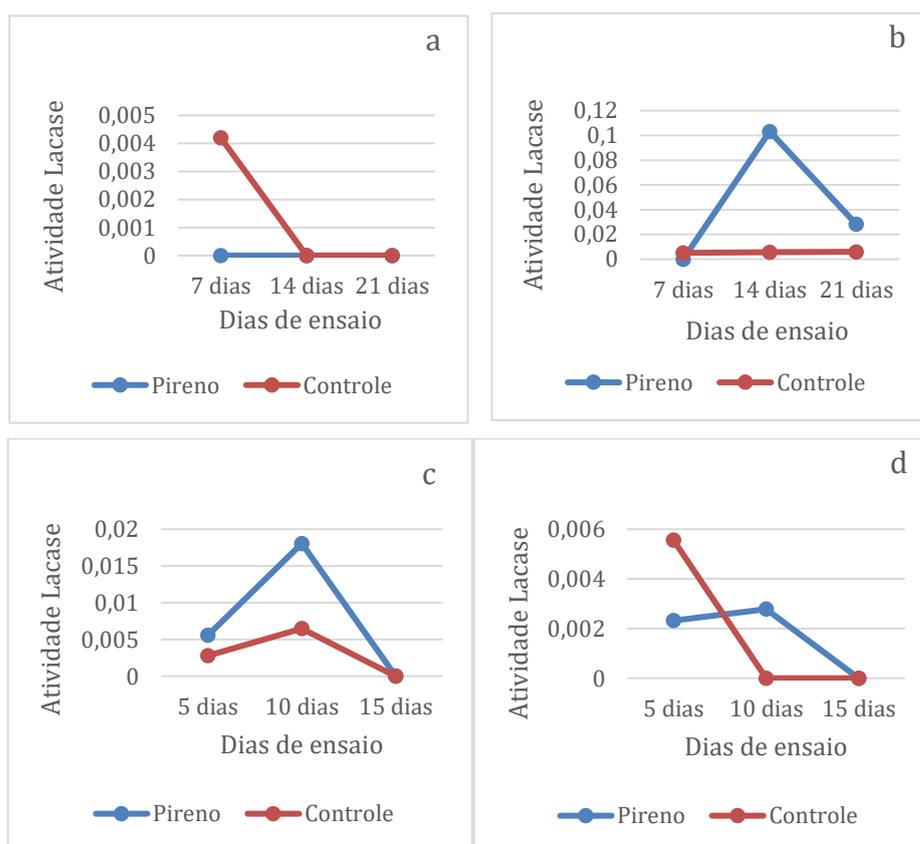
A enzima lacase está envolvida na degradação de lignina, e por sua inespecificidade podem atuar em compostos com estrutura química semelhante a lignina, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Assim, a produção de lacase por microrganismos tem sido investigada em potenciais biorremediadores de contaminação por petróleo (VIPOTNIK, MICHELIN e TAVARES, 2021).

Os sobrenadantes resultantes dos testes de tolerância ao pireno foram submetidos ao ensaio de avaliação a atividade de lacase utilizando o substrato ABTS. Todos os isolados foram capazes de sintetizar uma pequena quantidade (0,002 a 0,103 UL<sup>-1</sup>) da enzima lacase. Entretanto, o fungo FAR18 teve a atividade da enzima aumentada em 17% e as bactérias BADL17 e BADL15 apresentaram um discreto aumento de 1,8% e 1,7%,

respectivamente na presença do pireno.

Foi possível perceber que BADL17 apresentou maior produção de lacase na presença de pireno, e que BADL15 teve a produção de lacase mantida estável na presença do pireno. Observou-se também que o 10º dia, foi o pico de produção enzimática para as duas linhagens bacterianas, na presença de pireno, e depois desse período a tendência foi em diminuir a atividade, até cessar a produção (Figura 10).

**Figura 10 - Produção da enzima lacase pelos isolados mais eficientes, cultivados a 15° C e 150 RPM de agitação. Controle: Cultivo de microrganismo sem pireno. Fonte: a própria autora.**



**Legenda: (a) FAD28, (b) FAR18, (c) BADL17, (D) BADL15. Desvio padrão +/- 0,06.**

Existem poucos estudos relatando a produção da enzima lacase por bactérias de ambientes frios (Mukhopadhyay, Dasgupta e Chakrabarti, 2015). No estudo de Park *et al* (2021), 73 bactérias foram isoladas de solo Antártico e Ártico, sendo 71% delas, contendo genes ligados a oxidase com regiões de ligação de íons cobre I e II, que são essenciais para a atividade da lacase. No trabalho de Wang *et al* (2022), uma linhagem de *Psychrobacter* sp. isolada do mar Antártico foi capaz de sintetizar um novo tipo de lacase adaptada ao frio, com capacidade de degradar polietileno (13,2%). No estudo de Moghdam *et al* (2016), 13 linhagens bacterianas de *Psychrobacter* sp., isoladas do mar e sedimento marinho Ártico, exibiram produção de lacase (teste com meio sólido contendo guaiacol);

uma análise genômica mostrou a presença de seis genes ligados a oxidase multicopper, indicando possível envolvimento com a atividade de lacase observada.

A produção de lacase também ocorreu com o fungo FAR18, do gênero *Cladosporium*, em que observou-se maior produção de lacase no 14º dia na presença de pireno. O estudo de Wentzel *et al.* (2019) também relatou pequena produção de lacase, abaixo de  $0,2 \text{ UL}^{-1}$  por fungos filamentosos isolados da ilha Rei George, de vários gêneros, incluindo *Cladosporium*.

Produção da enzima lacase também foi registrada no estudo de Wiśniewska *et al.* (2021), em que leveduras *Kabatiella bupleuri* isoladas da ilha Rei George mostraram atividade de lacase ( $215 \text{ UL}^{-1}$ ) sob condições ótimas, e capacidade de descoloração de cristais violeta (40,4%) pela enzima. No estudo de Rovati *et al.* (2013), leveduras isoladas da ilha Rei George apresentaram produção de lacase (25%), bem como atividade ligninolítica (38%) e descoloração de corantes (33%).

Outro aspecto importante é a relação da atividade enzimática de microrganismos psicotolerantes com o aumento da temperatura nos ambientes polares, pois nessa situação o ambiente favorece a temperatura ótima para produção e ação dessas enzimas, sinalizando uma consequência das mudanças climáticas ocorridas nos últimos anos (PARK *et al.*, 2021; YERGEAU e KOLWALCHUK, 2008).

A atividade de enzimas como a lacase por microrganismos provenientes de ambientes pobres em lignina como a Antártica, pode indicar que a contaminação por substâncias como HPAs, como o que ocorre na ilha Rei George, vem funcionando como fonte de carbono e substrato para a atuação da lacase (WENTZEL *et al.*, 2019). Outra possibilidade é que a presença de HPAs oriundas de atividade vulcânica, como na ilha *Deception*, também ocasione essa atividade enzimática (SANTOS *et al.*, 2022).

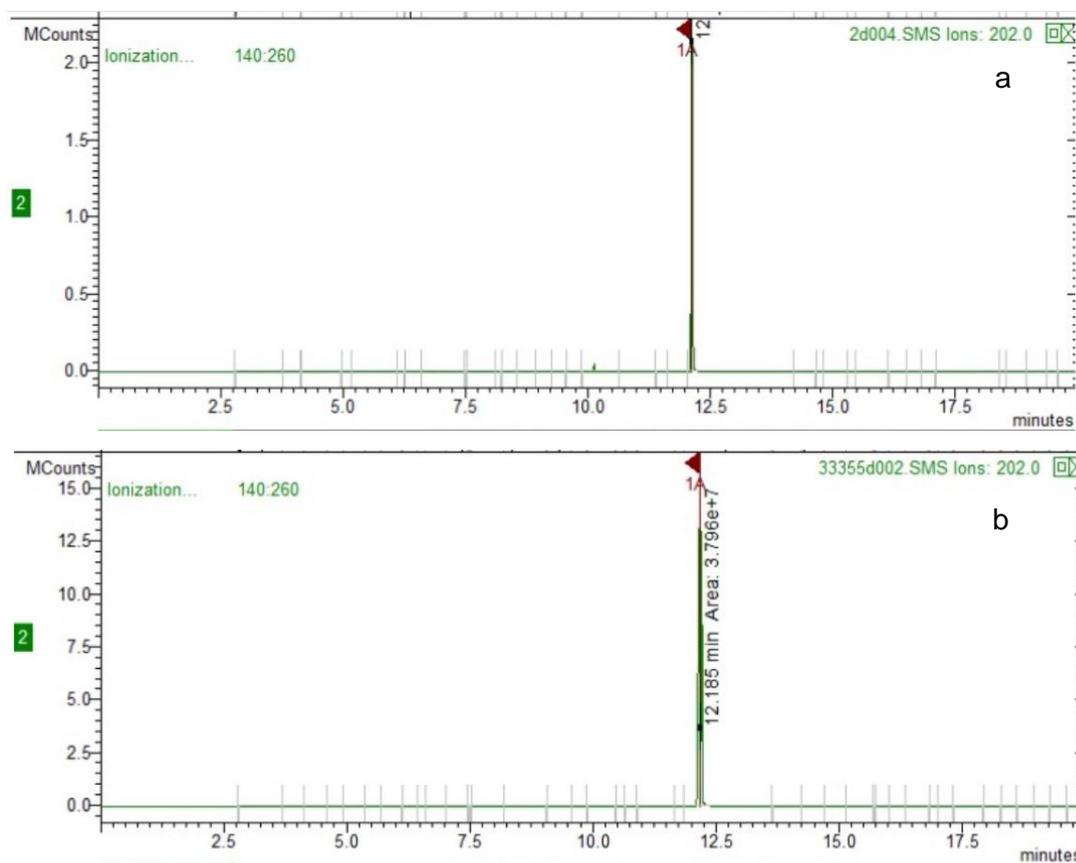
#### 4.7 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO PIRENO

O fungo *Cladosporium* sp. FAR18 e a bactéria *Psychrobacter* sp. BADL17 foram submetidos ao teste de degradação do hidrocarboneto pireno, porém prováveis problemas técnicos na execução dos experimentos geraram resultados inconclusivos.

No teste com a bactéria, o tempo zero teve a área de pico  $4,244 \times 10^6$  e o tempo de retenção do pireno foi de 12,136 min. Após 7 dias de cultivo, foi observado uma área de pico  $1,890 \times 10^7$  e o tempo de retenção do pireno foi de 11,962 min. É possível perceber que a área do pico correspondente a presença do pireno está maior, em

comparação que a amostra padrão. Os tempos de retenção do pireno confirmam a presença desse composto nas amostras (Figura 11).

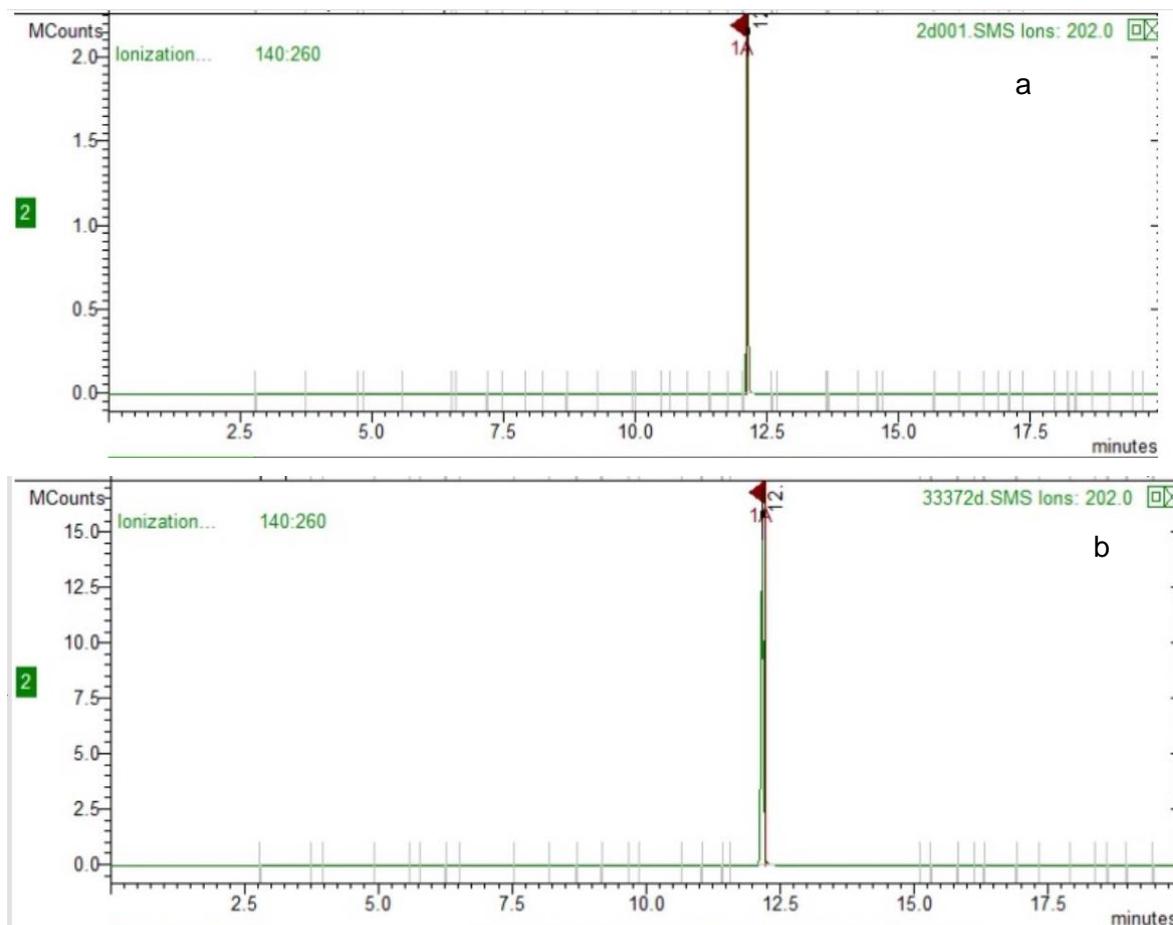
**Figura 11 – Análise da degradação do hidrocarboneto pireno pela bactéria *Psychrobacter* sp. BADL17. Fonte: a própria autora.**



**Legenda: (a) Tempo zero (curva); (b) Cultura bacteriana depois de 7 dias.**

Assim, como na cultura bacteriana, a cultura fúngica apresentou área maior na cultura de 7 dias ( $2,337 \times 10^7$ ) que a área do pico do tempo zero do pireno ( $4,724 \times 10^6$ ). O tempo de retenção do pireno na cultura depois de 7 dias foi de 12,189 min, e no tempo zero do pireno foi de 12,138 min, mostrando a presença do pireno nas amostras (Figura 12).

Figura 12 – Análise da degradação do hidrocarboneto pireno pelo fungo *Cladosporium* sp. FAR18. Fonte: a própria autora.



Legenda: (a) Padrão pireno (curva); (b) Cultura fúngica depois de 14 dias.

Esperava-se que as áreas dos extratos fermentativos depois dos dias de cultivo, fossem iguais, indicando nenhuma degradação, ou menores que os valores de área do tempo zero, indicando degradação do hidrocarboneto. Problemas técnicos no processamento das amostras ou no transporte delas para a empresa que fez a análise cromatográfica, podem ter ocorrido e interferido nos resultados que se mostraram inconclusivos, pois a área do pireno, depois de vários dias de cultivo se apresentou maior que a área do tempo zero, nas culturas do fungo e da bactéria.

Bactérias de ambiente frio tem sido descritas como degradadoras de hidrocarbonetos. No estudo de Eriksson, Dalhammar e Mohn (2002), dois isolados de solo ártico, do gênero *Pseudomonas* foram capazes de crescer e formar biofilme em cristais de pireno, degradando  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de pireno em 60 dias.

No estudo de Margesin, Moertelmaier e Mair (2013), a bactéria (isolada dos alpes italianos) *Rhodococcus erythropolis* foi capaz de degradar fenol (7,5 mM), antraceno

e pireno ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . No trabalho de Govarthanan *et al* (2017), o fungo *Penicillium* sp. isolado de solos Antárticos, foi capaz de degradar decano (49%), butilbenzeno (42%) e dodecano (33%).

Os estudos de degradação do pireno com o fungo FAR18 *Cladosporium* sp. e a bactéria BADL17 *Psychrobacter* sp. devem ser repetidos futuramente. O potencial dos microrganismos isolados de regiões frias, como a Antártica, para a degradação de HPAs deve continuar a ser investigado para ampliar o uso de linhagens microbianas na biorremediação de ambientes polares.

Os microrganismos que tiveram os melhores desempenhos nos ensaios de tolerância aos derivados de petróleo, descoloração do corante RBBR e produção de biossurfactantes e emulsificantes estão descritos na tabela 3.

**Tabela 3 – Principais resultados avaliados no presente estudo. Microrganismos com resultados positivos nos testes de tolerância a óleo diesel e gasolina, descoloração do corante RBBR e produção de biossurfactantes (colapso da gota e E<sub>24</sub>)**

Microrganismo	Tolerância		Descoloração RBBR		Colapso da gota	Emulsificação (%)
	Diesel	Gasolina	Sólido (cm)	Líquido (%)		
BADL1					+	6,4
BADL11					++	4,8
BADL12	x					
BADL13	x					
BADL15	x	x				
BADL16	x					
BADL17	x				+	3,6
BADL18					++	8,6
BADL19					+	7,6
BADL2					+	0
BADL25					++	11,1
BADL3					+	4,8
BADL45					+	18,2
BADL5					+	3
BADL51					+	0
BADL52					++	0
BADL6					+	4,2
BADL7					++	2,7
BADL8					++	3,3
BADL9					++	2,8
BARL12					+	3,9
BARL8					+	8,2
FAD23			x			
FAD27			x			
FAD28			x	83,3		
FAD29			x			
FAR18			x	68,9		
FAR21			x			
FAD33						3,7
FAD7					+	5
FAD3					+	
FAD9					+	
FAR22			x			
BARL2	x					
BARL13	x					

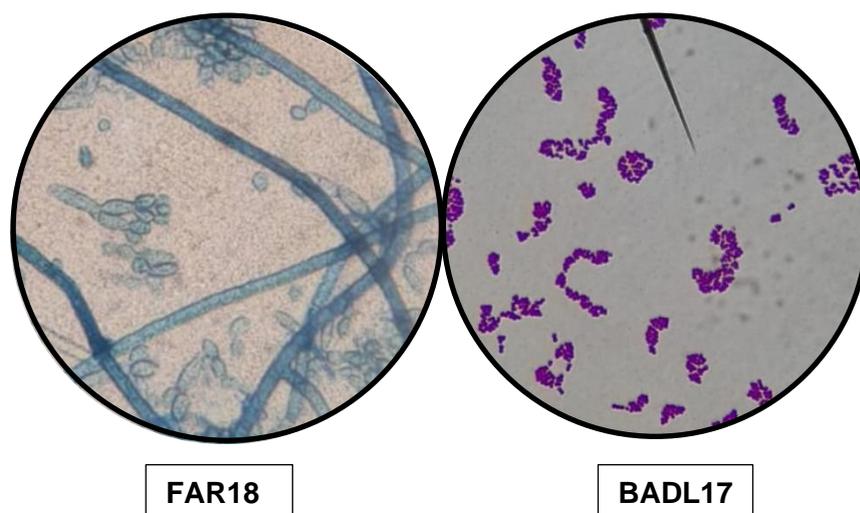
**Legenda: (+) Gota parcialmente colapsada, (++) Gota colapsada como no controle positivo.**

Curiosamente, quase todos os microrganismos isolados que apresentaram algum resultado positivo nos testes realizados tiveram resultado negativo nos outros ensaios, isto é, os microrganismos com algum potencial biorremediador apresentaram apenas uma característica analisada.

## 4.8 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A identificação taxonômica com ferramentas moleculares mostrou que o fungo FAR18 pertence ao gênero *Cladosporium* sp. e a bactéria BADL17 ao gênero *Psychrobacter* sp. (Figura 13).

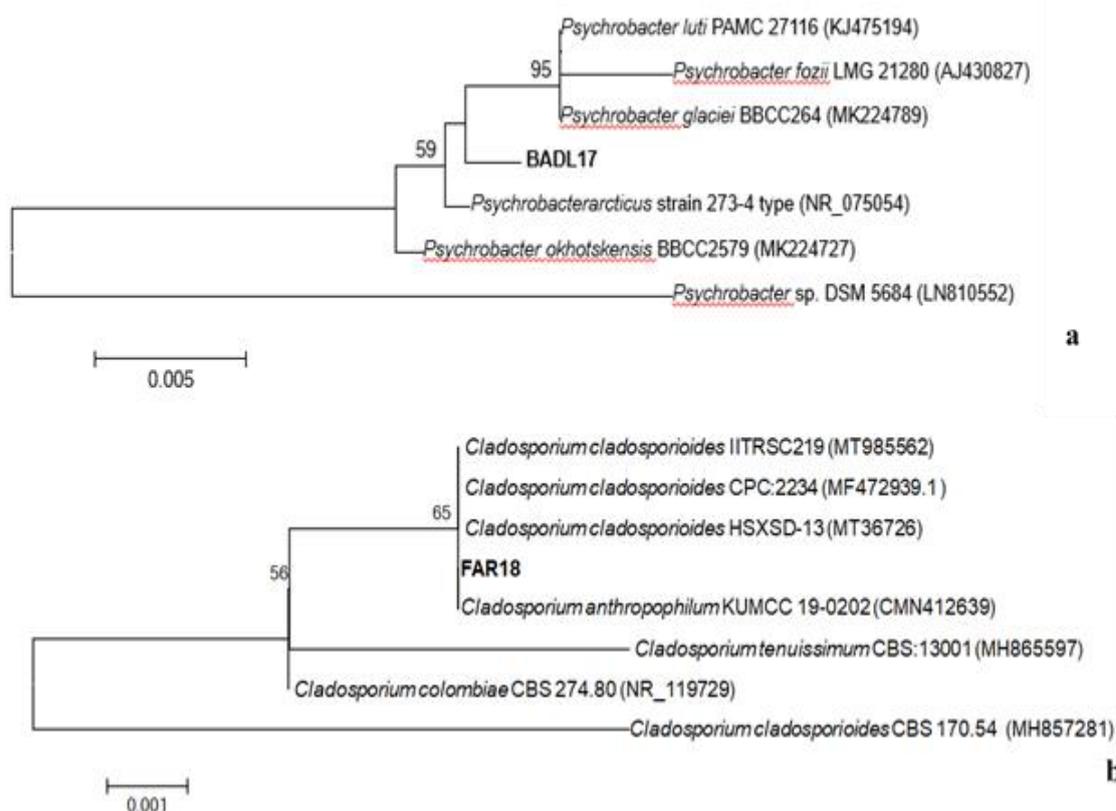
**Figura 13 – Observação microscópica dos microrganismos FAR18 e BADL17. Aumento de 40x e 100x, respectivamente. Fonte: a própria autora.**



A análise do gene RNAr 16S da linhagem bacteriana BADL17 mostrou que ela pertence ao gênero *Psychrobacter* sp., com 99% de similaridade, e 100% de similaridade com as espécies *Psychrobacter arcticus* (KF424828), *Psychrobacter glaciei* (MT309522) e *Psychrobacter fozii* (KY405997), de acordo com a análise do banco de dados GenBank.

A análise da região ITS da linhagem fúngica FAR18 revelou que a sequência da linhagem tem 100% de similaridade com o gênero *Cladosporium* sp. e 96% de cobertura de consulta com as espécies *Cladosporium cladosporioides* (MT367262) e *Cladosporium antropophilum* (MF472921), assim foi identificado como pertencente ao gênero *Cladosporium* (Figura 14).

Figura 14 – Análise filogenética dos isolados BADL17 (a) e FAR18(b). Fonte: a própria autora.



**Análise filogenética baseada na sequência parcial dos genes rRNA 16S (a) e ITS (b) dos melhores isolados com potencial biorremediador selecionados no estudo. Valores de bootstrap (1.000 replicas). Os números de acesso do GenBank são listados após nomes de espécies.**

Fungos do gênero *Cladosporium* têm sido encontrado em diversos ambientes Antárticos, como solo (NEWSHAM *et al*, 2021), gelo, neve, água do mar (ROSA *et al*, 2020), *permafrost* (KOCHKINA *et al*, 2012), madeira e outros materiais orgânicos (DUNCAN *et al*, 2008), bem como solos das ilhas *Deception* (ROSA *et al*, 2020), Rei George (SANTOS, MEYER e SETTE, 2020) e sedimento marinho dessa última ilha (WENTZEL *et al*, 2018).

Esse gênero fúngico é considerado cosmopolita, e muitos de seus representantes têm demonstrado adaptações para o ambiente de frio extremo, o que os tornam potenciais portadores de enzimas de uso biotecnológico, por causa das diferentes rotas bioquímicas utilizadas para a sobrevivência em baixas temperaturas (ROSA *et al*, 2019). O estudo de Duarte *et al.* (2017) mostrou linhagens do gênero *Cladosporium* isoladas da Antártica como produtores das enzimas xilanases, pectinases e catalases.

Esporos fúngicos da espécie *Cladosporium cladosporioides* foram encontrados no ar Antártico, e o gênero *Cladosporium* foi encontrado como um dos gêneros mais abundantes no ar e na neve em ambiente peninsular Antártico (ROSA *et al*, 2020b). *Cladosporium cladosporioides* já foi encontrado em amostras de madeira, solo ornitogênico, algas e plantas Antárticos e solos subantárticos (FERRARI *et al*, 2011), podendo crescer entre 0.0 e 32 °C, com temperaturas ótimas de 20 °C a 28 °C, caracterizando um microrganismo psicrotolerante (DUARTE *et al*, 2018).

O gênero *Psychrobacter* tem sido descrito como aeróbias, psicrófilas a psicrotolerantes (SILVA *et al*, 2018), habitando diversos ambientes polares como solos ornitogênicos, neve, permafrost e sedimento marinho (BAKERMANs *et al*, 2006). Exibem características como produção de biossurfactantes e emulsificantes (RICCARDI *et al*, 2022) (TRUDGEON *et al*, 2020), capacidade de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros poluentes. São capazes de utilizar fontes de carbono diferentes da glicose, tais como ácido úrico, bastante presente em solos ornitogênicos comuns na Antártica (BOWMAN *et al*, 1996).

Além disso, possuem adaptações para resistência ao congelamento (MOREIRA *et al*, 2022) e escassez hídrica (NOBREGA *et al*, 2021), comuns no ambiente polar e produzem enzimas eficientes em baixas temperaturas (XUEZHENG *et al*, 2010), papel indispensável para que possam atuar como degradadores de hidrocarbonetos em ambientes de frio extremo (PANICKER *et al*, 2002; YUMOTO *et al*, 2020).

Considerando que o gênero *Psychrobacter* abriga diversas espécies com característica e habilidades diferentes, estudos complementares devem ser realizados para investigar possíveis capacidades de tolerância e degradação de outros hidrocarbonetos, atividade biosurfactante e produção de enzimas ligninolíticas utilizando os melhores isolados microbianos apontados no atual estudo.

Microrganismos recuperados de amostras marinhas da Antártica apresentam um grande potencial biorremediador frente a HPAs e corantes, devido a síntese de enzimas ligninolíticas e/ou compostos com potencial atividade biossurfactante.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o continente Antártico abriga uma comunidade microbiana diferenciada e adaptada às condições polares, incluindo baixas temperaturas e tolerância a compostos derivados do petróleo. Os isolados recuperados dos sedimentos coletados na Ilha *Deception* apresentaram um maior potencial uso em processos de biorremediação de compostos derivados do petróleo, em comparação com os isolados recuperados das amostras da ilha Rei George, devido, muito provavelmente ao histórico das atividades de exploração de óleo de Baleia bem como ao alto impacto antropogênico oriundo das atividades turísticas e a presença de cinzas vulcânicas.

A metodologia de enriquecimento do meio de cultivo com óleo diesel e gasolina pode ter funcionado como uma pré-triagem para a seleção de linhagens bacterianas de ambientes frios potencialmente tolerantes a compostos derivados do petróleo, incluindo o HPA pireno. Entretanto, não foi possível evidenciar uma real degradação do composto pireno, na presença das melhores linhagens potencialmente bioremediadoras destes compostos xenobióticos.

Os microrganismos que habitam o continente Antártico podem apresentar potencial biotecnológico para uso em processos de bioremediação de ambientes frios, impactados com compostos derivados do petróleo, devido a produção de enzimas ligninolíticas bem como de compostos com potencial atividade biossurfactante, ambos em temperaturas baixas.

Os resultados do presente estudo encorajam novos ensaios de caracterização da enzima lacase e dos compostos com potencial atividade biossurfactante bem como novos ensaios de degradação do HPA pireno e/ou outros hidrocarbonetos, visando detecção dos metabólitos menos tóxicos que o composto original e/ou total mineralização destes compostos recalcitrantes.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULRASHEED M, *et al.* Biodegradation of diesel oil by cold-adapted bacterial strains of *Arthrobacter spp.* from Antarctica. **Antarct Sci.** 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0954102020000206>>. Acesso em 24 Ago 2022.

AHN Y *et al.* Oligotrophic Media Compared with a Tryptic Soy Agar or Broth for the Recovery of *Burkholderia cepacia* Complex from Different Storage Temperatures and Culture Conditions. **J Microbiol Biotechnol.** 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06024>>. Acesso em 15 Ago 2022.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclét. Quím.** São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43. 2010.

ARAUJO, M. E., RAMALHO, C. W. N., MELO, P. W. Pescadores artesanais, consumidores e meio ambiente: consequências imediatas do vazamento de petróleo no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Caderno de saúde pública** Vol. 36. N. 1. 2020.

BAKERMANS C, *et al.* *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. **Int J Syst Evol Microbiol** 56:1285–1291. 2006

BAWEJA, M., NAIN, L., KAWARABAYASI, Y., SHUKIA, P. Current arid-to-hyperarid Antarctic soil microbiomes: a tale of two oases. **Microbiome.** Vol. 8. 2020.

BENEGAS G R S, BERNAL S P F, DE OLIVEIRA V M, PASSARINI M R Z (2021) Antimicrobial activity against *Microcystis aeruginosa* and degradation of microcystin-LR by bacteria isolated from Antarctica. **Environ Sci Pollut Res** 28: 52381-52391.

BERNAL S P F, GRITTI M A, DOS SANTOS, V P, OTTONI, J R, DE OLIVEIRA V M, PEICHOTO M E, PASSARINI M R Z. Pharmaceutical biotechnological potential of filamentous fungi isolated from textile industry. **Arch Microbiol** 203: 3933-3944. 2021.

BERNAL S P, *et al.* Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: isolation, enzymatic activity and dye discoloration. **An Acad Bras Ciênc.** 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191581>>. Acesso em 24 Ago 2022.

BOAVENTURA, S., BACCI JR, M., SETTE, L. D. Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses. **Environmental Science and Pollution Research.** 2019.

BODOUR, A. A. *et al.* Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, n. 6, 2003.

BOWMAN J P, *et al.* Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. **Int J Syst Bacteriol** 46:841– 848. 1996

BROWN HL, VAN VLIET AH, BETTS RP, REUTER M. Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model. **J Appl Microbiol.** 2013 Nov;115(5):1212-21. Disponível em: <doi: 10.1111/jam.12316>. Acesso

em 17 Ago 2022.

BUENO, J., *et al* (2019), *Biosurfactant production by yeasts from different types of soil of the South Shetland Islands (Maritime Antarctica)*. **J Appl Microbiol**, 126: 1402-1413. <https://doi.org/10.1111/jam.14206>

BUSWELL J A, CAI Y & CHANG S. *Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiol.** v.128, p.81-87. 1995

CENTURION V. B., *et al.* *Unveiling resistome profiles in the sediments of an Antarctic volcanic island*. **Environ Pollut.** 2019 v.255. Disponível em: <doi: 10.1016/j.envpol.2019.113240>. Acesso em 26 Ago 2022.

CENTURION, V.B., *et al.* *Comparing resistome profiles from anthropogenically impacted and non-impacted areas of two South Shetland Islands - Maritime Antarctica*. **Environ Pollut.** 2022. v.304, p.119-219. Disponível em: <doi: 10.1016/j.envpol.2022.119219>. Acesso em 24 Ago 2022.

CHANG Y *et al.* *Degradation of Toxic Compounds at Low and Medium Temperature Conditions Using Isolated Fungus*. **Clean – Soil, Air, Water**. 2016. Disponível em: <https://doi: 10.1002/clen.201500753>

CHAVES, F. S. **Bioprospecção de leveduras da Antártica para a produção de biossurfactante a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar**. 2017. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-20112017-125508/pt-br.php>>. Acesso em 01 Jul 2020.

COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. *Surface-Active Agents from Two Bacillus Species*. **Applied and environmental microbiology**. Vol. 53. N. 2. P. 224-229. 1987.

CORONEL-LEÓN J, *et al.* *Biosurfactant production by AL 1.1, a Bacillus licheniformis strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties*. **Ann Microbiol** v. 65, p.2065–2078. 2015.

CRUZ, G. F., MARSAIOLI, A. J. *Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios*. **Química Nova**. Vol. 35. N. 8. 2012.

DA SILVA, M., PASSARINI, M. R. Z., BONUGLI, R. C., SETTE, L. D. *Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: Isolation characterization and RBBR decolourisation screening*. **Environmental Technology**. Vol. 29. 2008.

DE JESUS, H.E., *et al.* *Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula*. **Appl Microbiol Biotechnol** v.99, p.10815–10827. 2015. Disponível em:< <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6919-0>.> Acesso em 26 Ago 2022.

PENA, P. G. L., *et al.* *Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão*. **Cadernos de Saúde Pública**. Vol. 36. 2020.

DONOSO, J. M. *Isolation and characterization of phenanthrene degrading bacteria from diesel fuel-contaminated Antarctic soils*. **Frontiers in microbiology**. Vol. 8. 2017.

DUARTE A W F *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Crit Rev Biotechnol.** 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1379468>. Acesso em 16 Ago 2022.

DUARTE A W F *et al.* Production of cold adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biol** 41:2511–2521. 2018

DUARTE B *et al.* First screening of biocides, persistent organic pollutants, pharmaceutical and personal care products in Antarctic phytoplankton from Deception Island by FT-ICR-MS. **Chemosphere.** 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129860>. Acesso em 16 Ago 2022.

DUARTE, A. W. F., *et al.* Cold- adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical reviews in biotechnology.** Vol. 38. N. 4. P. 600-619. 2018.

DUNCAN S M *et al.* Screening fungi isolated from historic Discovery Hut on Ross Island, Antarctica for cellulose degradation. **Antarct Sci** 20: 463–470. 2008.

MEIRE, R., AZEREDO, A., MACHADO TORRES, J. P. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis.** Vol. 11, Nº. 2, p. 188-201. 2007.

RIZZO, C., *et al.* Effects of a Simulated Acute Oil Spillage on Bacterial Communities from Arctic and Antarctic Marine Sediments. **Microorganisms.** Vol. 7. 2019.

ERIKSSON M, DALHAMMAR G, MOHN W W. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. **FEMS Microbiol. Ecol.** 40: 21-27. 2002.

FAIZULINA, E.R., *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. **Eurasian Journal of applied biotechnology.** N. 2. 2019

FERRARI B C, ZHANG C, DORST J V. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. **Front Microbiol.** 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00217>. Acesso em 15 Ago 2022.

FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S.. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, 23(6), 765-773. 2000.

FERRÉS I, *et al.* Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. **Adv Polar Sci.** 26: 71-79. 2015.

FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. Physiological aspects of hydrocarbon emulsification, metal resistance and DNA profile of biodegrading bacteria isolated from oil polluted sites. **Biotechnology Letters.** Vol. 22. P. 285-289. 2000.

LAMILLA, C., *et al.* *Streptomyces luridus* So3.2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. **PLoS ONE.** Vol. 4. N. 4. 2018.

GOVARTHANAN M, *et al.* Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the

filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. **RSC Adv** 7: 20716–20723. 2017.

GRAN-SCHEUCH A, et al. *Isolation and Characterization of Phenanthrene Degrading Bacteria from Diesel Fuel-Contaminated Antarctic Soils*. **Front Microbiol**. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01634>>. Acesso em 16 Ago 2022.

GRAN-SCHEUCH A, et al. *Effect of Co-contamination by PAHs and Heavy Metals on Bacterial Communities of Diesel Contaminated Soils of South Shetland Islands, Antarctica*. **Microorganisms**. 2020. Disponível em: <<https://doi:10.3390/microorganisms8111749>>. Acesso em 14 Ago 2022.

HANANO, A., SHABAN, M., ALMOUSALLY, I. *Biochemical, molecular, and transcriptional highlights of the biosynthesis of an effective biosurfactant produced by Bacillus safensis PHA3, a petroleum-Dwelling bacteria*. **Frontiers in microbiology**. Vol. 8. 2017.

GEYER, A., et al. *Deciphering the evolution of Deception Island's magmatic system*. **Scientific Reports**. Vol. 9. 2019.

HUGHES K A, BRIDGE P, CLARK M S. *Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons*. **Sci Total Environ**. 372, 539–548. 2007.

I. C., CORMACK, W. P. M. *Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica*. **Journal of basic microbiology**. Vol. 57. N. 6. P. 504-516. 2017.

IBRAHIM S et al. *Biosurfactant Production and Growth Kinetics Studies of the Waste Canola Oil-Degrading Bacterium Rhodococcus erythropolis AQ5-07 from Antarctica*. **Molecules**. 2020. Disponível em: <<https://doi:10.3390/molecules25173878>>. Acesso em 13 Ago 2022.

JACQUES, R. J. S., BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O. *Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos*. **Ciência e natureza**. Vol. 29, p. 7-24. 2007.

<[http://www.repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/316913/1/Magrini\\_Maria naJuventina\\_M.pdf](http://www.repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/316913/1/Magrini_Maria%20naJuventina_M.pdf)>. Acessado em 30 de Junho de 2020.

JESUS H E, PEIXOTO R S, ROSADO A S. *Bioremediation in Antarctic Soils*. **J Pet Environ Biotechnol**. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000248>>. Acesso em 25 Ago 2022.

JESUS H., et al. *Microbial Succession under Freeze–Thaw Events and Its Potential for Hydrocarbon Degradation in Nutrient-Amended Antarctic Soil*. **Microorganisms**. 2021; 9(3):609. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030609>>. Acesso em 24 Ago 2022.

JOSHI-NAVARE K, SINGH P K, PRABHUNE A A. *New yeast isolate Pichia caribbica synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality*. **Eur J Lipid Sci Technol** 116: 1070–1079. 2014.

JURELEVICIUS D, et al. *Distribution of alkane-degrading bacterial communities in soils from King George Island, Maritime Antarctic*. **Eur J Soil Biol**. 51: 37-44. 2012.

JURELEVICIUS, D., et al. *Metagenomic analysis of microbial communities across a transect from low to highly hydrocarbon-contaminated soils in King George Island, Maritime*

- Antarctica*. **Geobiology**, 20, 98– 111. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/gbi.12472>>. Acesso em 24 Ago 2022.
- KAWADA, K., *et al.* Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. **Acta Med**. Vol. 56. N. 3. P. 129-134. 2002
- KHALIL, K. A., YASID, N. A. Evaluation of conventional and response surface level optimisation of *n*-dodecane (*n*-C12) mineralisation by psychrotolerant strains isolated from pristine soil at Southern Victoria Island, Antarctica. **Microbial Cell Factories**. Vol. 17. N. 44. 2018.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**. 1980. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/BF01731581>>. Acesso em 15 Ago 2022.
- KITA D M, *et al.* Antarctic fungi applied to textile dye bioremediation. **An Acad Bras Cienc**. 2022. Disponível em:< <https://doi.org/10.1590/0001-376520220210234>>. Acesso em 25 Ago 2022.
- KOCHKINA G *et al.* Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. **FEMS Microbiol Ecol** 82:501-509. 2011.
- KRUCON T, DZIEWIT L, DREWNIAK L. Insight Into Ecology, Metabolic Potential, and the Taxonomic Composition of Bacterial Communities in the Periodic Water Pond on King George Island (Antarctica). **Front Microbiol**. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708607>>. Acesso em 15 Jul 2022.
- MAGRINI, M. J. **Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas**. 2011. Dissertação. Disponível em: <[https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30\\_2542e54c11b873416c38fcb6824d19b](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP-30_2542e54c11b873416c38fcb6824d19b)>. Acesso em 15 Jul 2020.
- LOPERENA, L., *et al.* Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. V. 28. N. 5. P. 2249-2256, 2012.
- MALAVENDA R *et al.* Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons. **Polar Biol** v.38. p.1565–1574. 2015.
- MARGESIN, R., MOERTELMAIER, C., & MAIR, J. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (*n*-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 84. P. 185–191. 2013. Disponível em: <doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.004>. Acesso em 14 Jul 2020.
- MARTORELL M M, *et al.* Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. **Antarct Sci**. 2018. Disponível em:< <https://doi.org/10.1017/S0954102018000421>>. Acesso em 15 Julho 2020.
- MARTORELL M M, *et al.* Bioremediation Abilities of Antarctic Fungi. 2019. In: Tiquia-Arashiro, S., Grube, M. (eds) *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*. **Springer**. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_26)>. Acesso em 16 Jul 2022.

MIRANDA R J *et al.* *Oil Spill Disaster in Southwest Atlantic Coast: an Evaluation of Short-Term Effects on Coral Reef Benthic Assemblages.* **An Acad Bras Ciênc.** 2022. Disponível em: <DOI 10.1590/0001-3765202220210401>. Acesso em 15 Ago 2022.

MOGHADAM, M.S., ALBERSMEIER, A., WINKLER, A. *et al.* *Isolation and genome sequencing of four Arctic marine Psychrobacter strains exhibiting multicopper oxidase activity.* **BMC Genomics** v.17, p.117. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2445-4>>. Acesso em 20 Ago 2022.

MORAIS FILHO, M. C., CORIOLANO, A. C. F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **HOLOS.** Vol. 7. Disponível em <<https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/4278>>. Acesso em 15 Jul 2020.

MOREIRA E R, *et al.* *Potential for resistance to freezing by non-virulent bacteria isolated from Antarctica.* **An Acad Bras Ciênc.** 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210459>>. Acesso em 20 Ago 2022.

MOREIRA, F. X. V. D., ASSIS, H. C. S. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 130f. Tese (Doutorado em Biologia celular e molecular). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006. Disponível: <[https://www.researchgate.net/publication/26977867\\_Biomarcadores\\_de\\_contaminacao\\_ambiental\\_em\\_peixes\\_e\\_ostras\\_de\\_tres\\_estuarios\\_brasileiros\\_e\\_cinetica\\_de\\_derivados\\_solueveis\\_do\\_petroleo\\_em\\_peixes](https://www.researchgate.net/publication/26977867_Biomarcadores_de_contaminacao_ambiental_em_peixes_e_ostras_de_tres_estuarios_brasileiros_e_cinetica_de_derivados_solueveis_do_petroleo_em_peixes)>. Acesso em 25 Jun 2020.

MOUSSA S H *et al.* *Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity.* **J Mycol.** 2013 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/753692>>. Acesso em 25 Ago 2022.

MUKHOPADHYAY A, DASGUPTA A K, CHAKRABARTI K. *Enhanced functionality and stabilization of a cold active laccase using nanotechnology based activation-immobilization.* **Bioresour Technol.** 179: 573–584. 2015

NETO, F. T., STROPPER, J. L., DANI, N. **Tefrocronologia aplicada no estudo de material vulcânico da ilha Deception,** Antártica. 2004. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/53840/000438450.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 01 Jul2020.

NEVES, E. B. **Degradação de hidrocarbonetos aromaticos policiclicos por bactérias.** 2002. Disponível em: <file:///C:/Users/Dell%20Inspiron%2015/Downloads/Neves\_ElianeBrigidadas\_D.pdf.> Acesso em 13 Jul 2020.

NEWSHAM K K, *et al.* *Regional Diversity of Maritime Antarctic Soil Fungi and Predicted Responses of Guilds and Growth Forms to Climate Change.* **Front Microbiol.** 2021 Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.615659>. Acesso em 20 Ago 2022.

NOBREGA F *et al.* *Cold adapted desiccation-tolerant bacteria isolated from polar soils presenting high resistance to anhydrobiosis.* **BioRxiv.** 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1101/2021.02.06.430066>. Acesso em 17 Ago 2022.

OLIVEIRA L M. **Hidrocarbonetos em solo da área da Estação Antártica brasileira**

**Comandante Ferraz**. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa. 2005. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/10949/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em 15 Jul 2020.

OLIVEIRA, L. G., MANTOVANI, S. A. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**. São Paulo. v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OLIVEIRA, L. M. **Hidrocarbonetos em solo da área da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz**. 2005. 84f. Dissertação. (Mestrado em Solos e nutrição de plantas). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/10949>. Acessado em 30 de Junho de 2020.

PANICKER G, et al. Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. **Polar Biol**. 25:5-11. 2002.

PARK H J et al. Involvement of laccase like enzymes in humic substance degradation by diverse polar soil bacteria. **Folia microbiol**. 2021 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12223-020-00847-9>>. Acesso em 15 Ago 2022.

PASSARINI M R Z, et al. Undecane production by cold-adapted bacteria from Antarctica. **Extremophiles** 24: 863-873. 2020.

PASSARINI M R, et al. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Mar Pollut Bull** v.62, p. 364-370. 2011.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, n. 1, 2015.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

PEREIRA, Felipe Nóbrega. Além da Antártica: os limites da vida ao frio e à dessecação no âmbito da astrobiologia. 165f. Tese (Doutorado em biotecnologia). Universidade de São Paulo. 2015. Disponível em: <[doi:10.11606/T.87.2017.tde-26052017-093541](https://doi.org/10.11606/T.87.2017.tde-26052017-093541)>. Acesso em 08 Jul 2020.

PRÉNDEZ M, et al. Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in marine surficial sediment near Antarctic stations at Fildes Peninsula, King George Island. **Antarct Sci**. v.23. p. 578-588. 2011.

PRIMITZ, V. J. Bacterial communities and chemical parameters in soils and coastal sediments in response to diesel spills at Carlini Station, Antarctica. **Science of the Total Environment**. Vol. 605–606, p. 26–37. 2017.

PRIMITZ J V, et al. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from Carlini Station, Antarctica: effectiveness of different nutrient sources as biostimulation agents. **Polar Biol**. 2021 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02787-z>. Acesso em 24 Ago 2022.

RAAD M et al (2021) A defined medium based on R2A for cultivation and exometabolite profiling of soil bacteria. **BioRxiv**. Disponível em

<https://doi.org/10.1101/2021.05.23.445362>. Acesso em 20 Ago 2022.

RIBEIRO, I. D. A. *et al.* Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos e fenol por isolados bacterianos endofíticos de bambu. **Enciclopédia biosfera**. v. 13, p. 1386–1397, 2016.

RICCARDI C *et al.* Genome analysis of a new biosurfactants source: The Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. TAE2020. **Mar Genomics**. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.margen.2021.100922>>. Acesso em 20 Ago 2022.

RIZZO C *et al.* Cultivable Bacterial Communities in Brines from Perennially Ice-Covered and Pristine Antarctic Lakes: Ecological and Biotechnological Implications. **Microorganisms**. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8060819>. Acesso em 17 Ago 2022.

ROSA L H *et al.* DNA metabarcoding of fungal diversity in air and snow of Livingston Island, South Shetland Islands, **Antarctica Sci Rep**. 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78630-6>>. Acesso em 17 Ago 2022.

ROSA L H *et al.* DNA metabarcoding uncovers fungal diversity in soils of protected and non protected areas on Deception Island, Antarctica. **Sci.Rep**. 2020b Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78934-7>. Acesso em 20 Ago 2022.

ROSA, L H *et al.* Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. 2019 In: Rosa, L. (eds) *Fungi of Antarctica*. **Springer**, Cham. pp. 1-17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7>>. Acesso em 02 Jun 2022.

ROVATI J I, *et al.* Polyphenolic substrates and dyes degradation by yeasts from 25 de Mayo/King George Island (Antarctica). **Yeast**. V. 30. P. 459–470. 2013

RUSCASSO, F., *et al.* Antarctic yeasts: potential use in a biologic treatment of textile azo dyes. *Bioresour. Bioprocess*. 9, 18. 2022. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00507-5>. Acesso em 20 Ago 2022.

SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**. V.4. p.406–425. 1987

SANDOVAL-DENIS M, *et al.* New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. **Persoonia**. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3767/003158516X691951>. Acesso em 20 Ago 2022.

SANTOS A, *et al.* Metagenomic Characterization of Resistance Genes in Deception Island and Their Association with Mobile Genetic Elements. **Microorganisms** 15;10(7):1432. 2022.

SANTOS J A, MEYER E, SETTE L D. Fungal Community in Antarctic Soil Along the Retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). **Microorganisms**. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081145>. Acesso em 17 Ago 2022.

SCHULTZ J *et al.* Polyphasic Analysis Reveals Potential Petroleum Hydrocarbon Degradation and Biosurfactant Production by Rare Biosphere Thermophilic Bacteria From

*Deception Island, an Active Antarctic Volcano. Front Microbiol.* 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.885557>>. Acesso em 17 Ago 2022.

SILVA M K *et al.* *Extracellular hydrolytic enzymes produced by yeasts from Antarctic lichens. An Acad Bras Cienc.* 2022. Disponível em < <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210540>>. Acesso em 17 Ago 2022.

SILVA T R, *et al.* *Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. Polar Biol.* v.41. p. 1505-1519. 2018.

SILVA, I. S. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos utilizando consórcios microbianos visando a biorremediação de solos contaminados.** 2007. Disponível em: <[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/254750/1/Silva\\_IsisSerra\\_no\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/254750/1/Silva_IsisSerra_no_D.pdf)>. Acesso em 14 Jul 2020.

SOUSA, T. G. C. Seleção das leveduras do gênero rhodotorulas do ambiente antártico para produção de biossurfactante. 2016. 71f. Dissertação. (Mestrado em engenharia química). Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/304803>>. Acesso em 01 Jul 2020.

STYCZYNSKI M *et al.* Application of Psychrotolerant Antarctic Bacteria and Their Metabolites as Efficient Plant Growth Promoting Agents. **Front Bioeng Biotechnol.** 2022. Disponível em:<<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.772891>>. Acesso em 17 Ago 2022.

ZHANG, E., *et al.* *Lifting the veil on Technological Improvements in Enzymes toward Their Biotechnological Applications. Frontiers in microbiology.* Vol. 7. N. 965. 2016.

TRUDGEON B, *et al.* *Low-Temperature Biosurfactants from Polar Microbes. Microorganisms.* 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8081183>>. Acesso em 17 Ago 2022.

VERASOUNDARAPANDIAN G, *et al.* *A Review and Bibliometric Analysis on Applications of Microbial Degradation of Hydrocarbon Contaminants in Arctic Marine Environment at Metagenomic and Enzymatic Levels. Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph18041671>>. Acesso em 06 Ago 2022.

VERGEYNST L, *et al.* *In situ biodegradation, photooxidation and dissolution of petroleum compounds in Arctic seawater and sea ice. Water Res.* 2019 ;v.148. p.459-468. Disponível em: <doi: 10.1016/j.watres.2018.10.066>. Acesso em 20 Ago 2022.

VICENTE J, *et al.* *Microbial Communities Present in Hydrothermal Sediments from Deception Island, Antarctica. Microorganisms.* 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081631>>. Acesso em 20 Ago 2022.

VIEIRA G.A. L., *et al.* *Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. Chemosphere.* 2021. v.267. p.129-190. Disponível em <doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129190>. Acesso em 20 Ago 2022.

VIPOTRNIK Z, MICHELIN M, TAVARES T. *Development of a packed bed reactor for the*

- removal of aromatic hydrocarbons from soil using laccase/mediator feeding system. **Microbiol Res.** 245:126687. 2021.
- WENTZEL L C P *et al.* Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microb Ecol** 77: 12–24. 2019.
- WENTZEL, L. C. P. **Diversidade de fungos de solos antárticos e prospecção de enzimas ligninolíticas.** 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150952>>. Acesso em 30 Jun 2020.
- WIRTH S E, *et al.* *Psychrobacter sanguinis* sp. nov., recovered from four clinical specimens over a 4-year period. **Int J Syst Evol Microbiol** 62:49 –54. 2012.
- WIŚNIEWSKA K.M, TWARDA-CLAPA A, BIAŁKOWSKA A.M. Screening of Novel Laccase Producers—Isolation and Characterization of Cold-Adapted Laccase from *Kabatiella bupleuri* G3 Capable of Synthetic Dye Decolorization. **Biomolecules.** 11(6):828. . Disponível em:< <https://doi.org/10.3390/biom11060828>>. Acesso em 20 Ago 2022.
- WONG R R *et al.* Diesel in Antarctica and a Bibliometric Study on Its Indigenous Microorganisms as Remediation Agent. **Int J Environ Res Public Health.** 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph18041512>>. Acesso em 06 Ago. 2022.
- XUEZHENG L, *et al.* Cloning and heterologous expression of two cold-active lipases from the Antarctic bacterium *Psychrobacter* sp. **G Polar Res** 29:421– 429. 2010.
- YERGEAU E, KOWALCHUK G A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze–thaw cycle frequency. **Environ Microbiol** 10: 2223–2235. 2008.
- XU, X., *et al.* Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. **Frontiers in microbiology.** Vol. 5. 2018.
- YUMOTO I *et al.* *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. **Int J Syst Evol Microbiol** 52: 85–90. 2002.
- ZAKARIA, N.N.; *et al.* Oil Bioremediation in the Marine Environment of Antarctica: A Review and Bibliometric Keyword Cluster Analysis. **Microorganisms:** 9, 419. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020419>>. Acesso em 06 Ago. 2022.
- ZANPHORLIN, L. M. **Peroxigenases P450: estudo da relação enzima-substrato para aplicação em bioenergia.** 2019. Disponível em <<http://pages.cnpem.br/pibic/wp-content/uploads/sites/52/2019/04/Peroxigenases-P450-Estudo-da-rela%C3%A7%C3%A3o-enzima-substrato-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-em-bioenergia.pdf>>. Acesso em 08 Jul 2020.
- ZHANG A, *et al.* Characteristics and polyethylene biodegradation function of a novel cold-adapted 2 bacterial laccase from Antarctic sea ice psychrophile *Psychrobacter* sp. NJ228. **J Hazard Mater.** 2022. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4073317>>. Acesso em 06 Ago. 2022.