

Avaliação de fungos endofíticos e epifíticos com potencial para produção de biossurfactantes, isolados de macrófitas aquáticas do rio Negro em Manaus, Amazonas

Lima, JMS¹, Pereira, JO², Costa Neto PQ², Batista IH³, Santos JC¹, Araújo SP⁴, Pantoja, MC², Azevedo JL⁵

¹Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia, ² Universidade Federal do Amazonas-UFAM

³Universidade do Estado do Amazonas - UEA. ⁴ Pós-Graduação em Biotecnologia/UFAM, Manaus – AM – Brasil. ⁵Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP
Emails: jlazevedo@usp.br, mozanilzootec@hotmail.com, joseodairpereira@yahoo.com.br, jlima873@gmail.com, iedahbatista@gmail.com, spiresdearaujo@gmail.com

Resumo

Foram investigados fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas aquáticas *Eichhorniacrassipes* (Mart.) Solms e *Cyperus ligularis* L., coletadas em águas contaminadas com resíduos de petróleo para avaliação do potencial quanto à produção de biossurfactantes; os mais promissores foram identificados por meio do sequenciamento da região rDNA. Na seleção quanto à atividade biodegradadora de hidrocarbonetos o indicador utilizado foi 2,6 indofenol (DCPIP) em meio Bushnell-Haas(BH) acrescido de petróleo. Para a atividade biossurfactante, foram realizados os seguintes testes: Medida de emulsificação, colapso da gota, tensão superficial. Do total de vinte isolados, doze cresceram em meio BH e petróleo; dos quais, oito promoveram a descoloração do DCPIP. O isolado S31 apresentou moderada emulsão do diesel (1,5cm ou 52%) com redução da tensão superficial da água em 51,03 mN/m sendo identificado como *Phoma* sp. Os outros fungos identificados foram: *Rhizopus oryzae*, *Gibberella moniliformis*, *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. fujikuroie*, *Penicillium citreonigrum*, e apresentaram potencial para biodegradação de hidrocarbonetos. Novos estudos com o fungo *Phoma* sp. tornam necessários como o cultivo em diferentes fontes de carbono com o intuito de melhorar a produção de compostos secundários envolvidos na emulsificação e diminuição da tensão superficial da água.

Palavras chave: Biorremediação, bioemulsificantes, *Eichhornia*, *Cyperus*, petróleo, diesel

Introdução

Os biossurfactantes podem ser de origem microbiana e apresentam potencial para aplicações comerciais em diversos setores. Esses produtos são eficazes na recuperação avançada de petróleo e em processos de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Também possuem aplicações potenciais na agricultura, como insumos na área de cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, produtos de higiene pessoal, processamento de alimentos, dentre outros (Cola e Costa 2003; Sourav *et al.*, 2015). Apresentam vantagens sobre os surfactantes de origem sintética considerando sua biodegradabilidade e por apresentar baixa toxicidade.

Considerando-se que os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, os fungos endofíticos e epifíticos também podem possuir essa característica. Micro-organismos endofíticos segundo Azevedo (2008) são aqueles que habitam pelo menos um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, em oposição aos epifíticos que vivem na superfície das plantas.

As espécies *Curvularia clavata*, *Fusarium proliferatum* e *Phoma* sp. isolados de diferentes ambientes contaminados por hidrocarbonetos são as principais espécies citadas como produtores de biossurfactantes. Quanto à biodegradação de hidrocarbonetos, *Cladophialophora* e *Exophiala* assimilam tolueno; enquanto que *Aspergillus* sp. e *Penicillium* spp. degradam os hidrocarbonetos alifáticos, clorofenóis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas, corantes sintéticos e 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (Azevedo 2008; Oliveira *et al.*, 2008; Harms *et al.*, 2011; Bhardwaj *et al.*, 2015; Neoh *et al.*, 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos endofíticos e epifíticos, quanto à biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

Material e Métodos

Os micro-organismos foram isolados das macrófitas aquáticas *Cyperus ligularis* L. e *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms coletadas próximo à saída dos efluentes da refinaria da Petrobrás/Manaus-AM (REMAN). O cultivo foi em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Himedia) a 28°C por nove dias e repicados para meio Bushnell-Haas (BH) Broth (Sigma-Aldrich), acrescido de 2mL de petróleo. Após o crescimento micelial em BH por nove dias, discos de 5mm de diâmetro foram utilizados como pré-inóculo nos testes

subsequentes em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100mL de meio BH líquido, acrescido de 5 mL de petróleo,o pH foi ajustado para 5 e incubados por 14 dias a 30°C.

A identificação molecular foi realizada somente para as amostras com resultado positivo no teste indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) e aqueles com resultado acima de 1 cm para o índice de emulsificação. Para a extração do DNA foi utilizado o Plant/Fungy DNA isolation kit (NorgenBiotekCorp) conforme as recomendações do fabricante. Foram utilizados os *primers* ITS1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') e ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') para amplificação da região conservada em posições específicas do 18S e 28S do gene rDNA. Os amplicons foram purificados com polietileno glicol 8000 e sequenciados em analisador genético ABI 3500xL (AppliedBiosystems®). As sequências foram alinhadas e editadas no programa MEGA com agrupamento pelo método *Neighbor-Joining* e utilizadas para identificação dos isolados comparando-se com as sequências tipo com base nos resultados observados no BLASTn

O petróleo cru foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil e o diesel foi adquirido em posto de gasolinade bandeira BR, previamente filtrado. As dosagens de petróleo ou diesel foram utilizadas conforme Jaquiche-Matsuura *et al.*, (2014).

Teste de Biodegradabilidade Utilizando o Indicador Redox 2,6-Diclorofenol Indofenol (DCPIP)

O teste de biodegradabilidade foi realizado pela técnica do DCPIP (Hanson *et al.*, 1997). O experimento foi realizado em placa de poliestireno com 96 poços, a concentração de DCPIP foi ajustada para 0,010 g/mL. Em cada poço foram adicionados 200 µL da solução de DCPIP, 10 µL do petróleo de Urucu, e inóculo do fungo correspondendo a 2±3 mm de diâmetro. As placas foram mantidas em temperatura ambiente (27±2 °C). As medidas do tempo para descolorir o meio foram realizadas após 24 e 48 horas. Como controle positivo foi utilizado DCPIP com petróleo, e controle negativo somente o indofenol.

Meio Específico para Produção de Biossurfactantes

A produção de biossurfactante foi realizada em 50 mL de meio de cultura constituído de MgSO₄.7H₂O 0,5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NaNO₃ 3 g/L, extrato de levedura 1 g/L e peptona 0,3 g/L, com pH ajustado em 5 para fungos filamentosos, modificado de Rapp e Backhaus (1992). Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel ou petróleo a 1,0% v/v.

O cultivo microbiano foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL a 30°C em incubadora orbital (New BrunswickScientific) com agitação constante de 150 rpm, por 20 dias. FrascosErlenmeyer com 50 mL de meio de cultura e 1% de óleo diesel(v/v), sem o inóculo, foi utilizado como controle. Cada micro-organismo foi cultivado em triplicata. Após o período de incubação, os meios de cultura foram filtrados em membrana filtrante (TPP, Europe/Switzerland) com porosidade de 0,45 mm acoplada à seringa esterilizada de 20 mL.

Teste Qualitativo do Colapso da Gota de Óleo

O teste foi realizado em placas de Petri(60 x 12 mm) com 3,5 mL do extrato filtrado livre de células. Para realizar o teste, uma gota de petróleofoi adicionada ao extrato livre de células, em triplicata, e observados nos tempos 0, 1, 5, 30 min, 1e72 horas. O resultado foi considerado positivo quando houve dispersão da gota de petróleo. Como controle negativofoi utilizado 3,5 mL do extrato, porém sem o fungo; e 3,5 mLda solução do surfactante Sódio Dodecil Sulfato (SDS)a1M, como controle positivo.

Avaliação da Atividade de Emulsificação

O meio específico para a produção de biossurfactantes foifiltrado e avaliado quanto à atividade de emulsificação do tipo água em óleo (A/O). O teste foi realizado em triplicata. Adicionou-se em tubos de ensaio 3MI dos extratos das culturas livres de células e 2 mLde diesel.Foram agitados por dois minutos em vortexa 70 rpme 24 horas em repouso. Após esse período, a altura do petróleo emulsificado (cm) foi comparada à altura total (Cooper e Goldenberg 1987). O índice de emulsificação foi medido segundo as convenções adotadas por Paraszkiwiczet al.,(2001) e calculado conforme a equação (1): $E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$ Índice de emulsificação após 24 h (%), $H_{emulsão}$ = Altura da emulsão, H_t = Altura total.

$$\text{Equação (1): } E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

Avaliação da Tensão Superficial

A medida da tensão superficial é uma ferramenta comum e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. À medida que o micro-organismo cresce, ele sintetiza o biossurfactante e este metabólito é lançado ao caldo metabólico, reduzindo a tensão

superficial. A tensão superficial foi medida no tensiômetro modelo Kruss (K-6, Alemanha), pelo método do anel (Du Noüy). As análises foram realizadas com o sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra bruta a 25°C.

Resultados

Oito fungos selecionados pelo crescimento no meio BH acrescido de petróleo foram identificados por meio do sequenciamento de parte do gene rDNA. Os fragmentos do gene rDNA contendo a região ITS1-5,8S-ITS2 apresentaram entre 531 a 562 pb. Os fungos epifíticos S31 e S36 isolados de *C. ligularis* foram identificados como *Phomasp.*; S24 *Rhizopus oryzae*; S32 *F. oxysporum*; S33 *Gibberella moniliformis* e S42 *F. proliferatum*. Entre os fungos endofíticos, S42 foi identificado como *F. fujikuroi* e S51 *Penicillium citreonigrum*, ambos provenientes de *E. crassipes*. O resultado das sequências mais relacionadas com as do *National Center for Biotechnology Information* estão na (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro-Amazonas/Brasil, utilizando como referência os dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

Iso*	Micro-organismos	Cod. NCBI	Hospedeiros	Endo.*	Epi.*	Id.*(%)
S24	<i>Rhizopus oryzae</i>	KJ460029.1	<i>Cyperusligularis</i>		X	99
S31	<i>Phomasp.</i>	KM979945.1	<i>C. ligularis</i>		X	100
S32	<i>Fusariumoxysporum</i>	JX406507.1	<i>Eichhornia crassipes</i>		X	99
S33	<i>Gibberella moniliformis</i>	EU151472.1	<i>C. ligularis</i>		X	98
S36	<i>Phomasp.</i>	KM246267.1	<i>C. ligularis</i>		X	100
S42	<i>F. proliferatum</i>	KJ020897.1	<i>C. ligularis</i>		X	99
S46	<i>F. fujikuroi</i>	KM369868.1	<i>C. ligularis</i>	X		99
S51	<i>Penicillium citreonigrum</i>	KF031329.1	<i>E. crassipes</i>	X		97

*Iso= Isolado; Endo= Endofítico; Epi= Epifítico; Id= Identidade

Entre os oito fungos analisados apenas *Phomasp.* (S31), mostrou-se eficiente nos diferentes testes realizados afim de selecionar os produtores de biossurfactantes. Os demais isolados, embora tenham dispersado a gota de petróleo em diferentes tempos, não formaram emulsão acima de 1 cm, conforme convenção adotada (Tabela 2).

Somente o *Phomasp.* (S31) foi selecionado para o teste de tensão superficial, pois foi positivo no teste do colapso da gota em menor tempo e emulsificação acima de 1 cm. A diferença entre a tensão superficial do extrato fúngico e a tensão superficial do controle foi de 2mN/m, porém em relação à água foi de 18,23 mN/m indicando possuir capacidade em romper a tensão superficial da água.

Tabela 2. Fungos endofíticos e epifíticos isolados de macrófitas do rio Negro – Amazonas/Brasil para produção de biossurfactantes

Isolado	Colapso da gota						Índice de emulsificação H _u /E ₂₄	Tensão superficial
	0	1 min	5 min	30 min	1h	72h		
<i>Phomasp.</i> (S31)	+	+	+	+	+	+	1,5 cm/52 %	51,03 mN/m
<i>Penicilliumcitreonigrum</i>	-	-	-	+	+	+	0,7 cm/38 %	-
<i>Phomasp.</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Fusarium fujikuroi</i>	-	-	-	-	-	-	0	-
<i>F. proliferatum</i>	-	+	+	+	+	+	0	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	±	±	±	±	0	-
<i>Gibberella moniliformis</i>	-	±	±	±	±	±	0	-
Controle								
SDS	+	+	+	+	+	+	100 %	
BH+PS	-	-	-	-	-	-	0	53,03 mN/m
Água								71,26 mN/m

*SDS = Sódio Dodecil Sulfato foi usado como controle positivo e o meio BH+PS=Petróleo sem o fungo, foi usado como controle negativo. H_u=altura emulsificada, E₂₄= índice de emulsificação em 24h

Discussão

O comportamento dos isolados que cresceram em meio BH com petróleo pode ser analisado segundo Jaques (2007); Maciel *et al.*, (2013) e Cruz *et al.*, (2014) onde, tanto fungos como bactérias podem ser biodegradadores de hidrocarbonetos. Os micro-organismos que apresentam sucesso no processo de degradação desses compostos devem produzir enzimas capazes de utilizar as complexas moléculas do petróleo em produtos intermediários de suas rotas metabólicas. Neste caso os fungos teriam duas rotas metabólicas uma não-lignolítica e a lignolítica; à exemplo dos fungos *Cunninghamella elegans*, e o fungo *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus fumigatus* e *C. Lunata* já estudados como degradadores de petróleo e seus derivados (Paraszkiwicz, *et al.*, 2001; Jaques *et al.*, 2007; Bhatt *et al.*, 2012).

Junior *et al.*, (2012) destacaram que fungos do gênero *Phoma* são bons produtores de lacase, enzima do grupo das fenoloxidas capazes de biodegradar compostos fenólicos e hidrocarbonetos; Carneiro (2010) corrobora com essa visão em um importante trabalho sobre biorremediação, utilizando micro-organismos na metabolização de vários compostos tóxicos, dentre eles o petróleo.

Harms (2011) relatou que culturas do gênero *Rhizopus* são potenciais degradadores de HPAs, o que de certa forma pode explicar o aparecimento de espécies deste gênero nos testes de seleção usando meio BH mais petróleo (Tabela 1). Balaji *et al.*, (2015), em trabalho realizado na Índia, citaram *Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*, isolados de solo contaminado por petróleo. Percebe-se que a maioria dos gêneros citados, também foram encontrados no presente trabalho (Tabela 1), indicando o potencial na produção de enzimas, que podem ser aplicado para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados.

O fungo filamentosos *C. Clavata* citado por Neoh *et al.*, (2014) e Neoh *et al.*, (2015) como biorremediador de efluentes da indústria de palma e produtora de enzimas lignolíticas, além de alta redução de compostos polifenólicos. A desintoxicação do efluente indica a adequação de *C. clavata* na biorremediação de efluentes orgânicos, esse fato é importante, pois pode direcionar futuros trabalhos utilizando fungos isolados nesta pesquisa, em processos semelhantes.

Os fungos isolados da Amazônia assemelham-se em relação ao tempo de oxidação do DCPIP, com o trabalho de Maciel *et al.*, (2013), que observaram os tempos de 14 e 25 horas para os fungos que promoveram a descoloração do indofenol. Os isolados de macrófitas promoveram descoloração em 24 horas. No trabalho de Luz *et al.*, (2011), o tempo de reação de oxidação ao indofenol foi de 96 horas. Maciel *et al.*, (2013) destacaram que os isolados responsáveis pela degradação: *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum* e *P. griseofulvum*. Outras espécies deste gênero isolados de macrófitas constam (Tabela 2).

Para Silva e Esposito (2004) a degradação de poluentes é realizada pelo sistema enzimático intracelular citocromo P450 monooxigenase que transforma produtos solúveis em água em menos tóxicos, levando ao processo de destoxificação. Provavelmente essas enzimas estão envolvidas nesse processo. Esses autores relataram que *Trichoderma* e *Fusarium* em solos contaminados por petróleo; *F. fujikuroi* e *F. oxysporum* foram isolados de macrófitas em ambiente contaminado por petróleo.

Quanto à produção de biossurfactantes embora os fungos filamentosos tenham crescido em meio BH com petróleo, como única fonte de carbono, a maioria não foi capaz de produzi-lo por meio dos testes seletivos como colapso da gota, índice de emulsificação e no teste de tensão superficial.

Phomasp. (S31) foi o único capaz de produzir colapso da gota de petróleo em menos de 1 min, assim como mostrou índice de emulsificação de 1,5 cm ou 52%, frente ao petróleo e ao diesel, este índice é considerado moderado, segundo Jaquiche-Matssura *et al.*, (2014); além disso produziu tensão superficial de 51,03 mN/m.

Esse fungo possui propriedade emulsificante, porém baixa capacidade de redução da tensão superficial em relação ao controle (53,03 mN/m) e maior capacidade de redução de tensão superficial em relação a água (72,01 mN/m) (Tabela 3). Talvez a baixa tensão superficial seja devido à dificuldade de utilização do hidrocarboneto presente no óleo diesel para a síntese de biossurfactantes (Decesaro *et al.*, 2013). Por outro lado, é provável que pelos testes realizados o biossurfactante presente no substrato do fungo, seja de alto peso molecular o que explicaria de fato a baixa tensão superficial e a presença de propriedade estabilizante do óleo diesel (Bento *et al.*, 2008).

A emulsão formada foi do tipo A/O, sugerindo que os compostos orgânicos presentes nesse emulsificante, possuem características hidrofílicas devido à formação da emulsão se dar sempre entre a água e o óleo diesel ou petróleo. Esta característica é importante na biorremediação de poluentes, pois pode auxiliar no processo de bioaugmentação ou bioestimulação, facilitando o crescimento fisiológico de outros micro-organismos no meio contaminado com hidrocarbonetos do petróleo (Nitschke e Pastore, 2002; Deon *et al.*, 2012; Jackisch-Matsuura *et al.*, 2014). Esses autores também citaram a dificuldade de se encontrar fungos filamentosos como bons produtores de biossurfactantes com capacidade de reduzir a tensão superficial, fato este observado nesta pesquisa. Por outro lado, a produção de bioemulsificante por fungos e bactérias podem ser utilizados em diversas aplicações tais como: indústria de alimentos, indústria de fabricação de tintas, entre outras (Bezerra *et al.*, 2012).

Herath *et al.* (2009) identificaram um composto lipopeptídico de estrutura cíclica a isolado de *Phoma* sp, classificado como *Phoma fungy*, que se mostrou eficiente como antifúngico em diversos testes realizados. Com exceção do trabalho de Herath *et al.*, (2009), não há citação de *Phoma* sp. como produtor de biossurfactante ou bioemulsificante, o que indica a realização de estudos futuros como *Phoma* sp. (S31) associado a produção de biossurfactantes

envolvendo espécies de *Phoma*, principalmente no que diz respeito ao cultivo em diferentes fontes de carbono, para que possa expressar a produção de compostos secundários envolvidos, tanto na emulsificação como na diminuição da tensão superficial.

Conclusões

Todos os fungos identificados mostraram-se promissores na degradação do petróleo e de diesel.

É necessário um aprofundamento em relação a produção enzimática por esses fungos visando prospectar enzimas de interesse comercial que estejam relacionadas à biodegradação de petróleo e seus derivados, principalmente com relação a produção de biossurfactantes pelo *Phoma* sp.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pelo auxílio dado à execução do projeto.

Referências

- Azevedo JL. (2008) Genética de microrganismos. Goiânia, G.O.
- Balaji V, Arulazhagan P, Ebenezer P (2014) Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J Environ Biol* 35: 3-9.
- Bento MF, Camargo FA, Gaylarde CC (2008) Biossurfactantes. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.). *Microbiologia Ambiental*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil, 152-184.
- Bezerra MS, Holanda VCD, Amorim JA, Macedo GR, Santos ES (2012) Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *Holos* 28: 14-27.
- Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK (2015) Isolation and purification of a new enamidebiosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Adv* 5:54783–54792.
- Bhatt R, Patel K, Trivedi U (2010) Purification and properties of extracellular poly (3-hydroxybutyrate) de polymerase produced by *Aspergillus fumigatus*. *J Polym Environ* 18: 141-147.
- Carneiro DA, Lucas PG (2010) A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. *Tecer* 3:82-95.
- Colla LM, Costa JV (2003) Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor* 13:85-103.

Cooper DG, Goldenberg BG (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53:224-229.

Cruz JM (2014) Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water Air Soil Pollut* 1:225-1962.

Decesaro A, Rigon MR, Thomé A, Colla LM. (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Quim. Nova* 36:947-954.

Deon MC, Rossi A, De Magro CD, Reinehr CO, Colla LM (2012) Bioremediation of contaminated soil with oils residuals through bioaugmentation and natural attenuation. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*33:73-82.

Hanson KG, Desai DJ, Desai AJA (1993) Rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 10: 745-748.

Harms H, Schlosser DW (2011) Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*9:177-192.

Herath K, Harris G, Jayasuriya H, Zink D, Smith S, Vicente F (2009) Isolation, structure and biological activity of phomafungin, a cyclic lipodepsipeptide from a Widespread Tropical *Phoma* sp. *Bioorg Med Chem* 17:1361-1369.

Jackisch-Matsuura AB, Santos LS, Eberlin MN, Faria AF, Grossman MJ, Durrant LR (2014) Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. *Braz Arch Biol Technol* 57:138-144.

Jacques RJS, Bento FM, Antonioli ZI, Camargo FO (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural* 37:1192-1201.

Junior NL, Gern RMM, Furlan SA, Schlosser D (2012) Laccase production by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1144-1156.

Luz CC, Santos EA, Santos MOS, Mussu MY, Yamashita M, Bastos WR (2011) Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. *Quim Nova*34:775-779.

Maciel CCS, Souza CS, Silva PA, Sousa MFVQ, Gusmão NB (2013) Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação. *R Brás Biocil* 1:39-42.

Moldes AB, Paradelo R, Vecino X, Cruz JM, Gudiña E, Rodrigues L, Barral MT (2013) Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecylsulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *Bio Med Research International*3:1-6.

Mollea C, Bosco F, Ruggeri B (2005) Fungal biodegradation of naphthalene: Microcosms studies. *Chemosphere* 60:636-643.

Neoh CH, Lam CY, Lim CK, Yahya A, Ibrahim Z (2015) Utilization of agro-industrial residues from palm oil industry for production of lignocellulolytic enzymes by *Curvularia clavata*. *Waste Biomass Valor* 6:385–390.

Neoh CH, Lam CY, Ware AYI, Ibrahim Z (2014) Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:4397–4408.

Nitschke M, Pastore GM (2002) Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quim Nova* 25:772-776.

Oliveira SD, Lemos JLS, Barros CA, Leite SGF (2008) O Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da Arte. *Série Tecnologia Ambiental* 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro. RJ.

Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długon'ski J (2002) Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularialunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol* 92: 287–294.

Paraszkiewicz K, Kanwal A, Długonski J (2002) Emulsifier production by steroidtrans forming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotechnol* 92:287–294.

Rapp, P, Backhaus S (1992) Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. *Enzymeand Microbial Technology* 14:938-943.

Silva M, Espósito E (2004) O papel dos fungos na recuperação ambiental. *In: Espósito E, Azevedo JL. (eds.) Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. EDUCS, Caxias do Sul, BR, 337-375.*

Sourav De, Susanta M, Ghosh A, Saha R, Saha B (2015) A reviewon natural surfactants. *RSC Adv* 5:65757-65767.