



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL**

CAMILA EMANUELLE MENDONÇA VIANA

**DESEMPENHO DE *Aspergillus niger* AN400 EM MEIO SALINO NA REMOÇÃO DE
BTX**

FORTALEZA

2025

CAMILA EMANUELLE MENDONÇA VIANA

DESEMPENHO DE *Aspergillus niger* AN400 EM MEIO SALINO NA REMOÇÃO DE
BTEX

Dissertação submetida a coordenação do curso de Mestrado acadêmico em Tecnologia e Gestão Ambiental do Programa de Pós-graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)- *Campus* Fortaleza como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa. Titular Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa.

Coorientadora: Profa. Dra. Victória Maura Silva Bermúdez.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V614d Viana, Camila Emanuelle Mendonça.
DESEMPENHO DE *Aspergillus niger* AN400 EM MEIO SALINO NA REMOÇÃO DE BTEX / Camila Emanuelle Mendonça Viana. - 2025.
98 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, Campus Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa.
Coorientação: Profa. Dra. Victória Maura Silva Bermúdez.
1. Biotratamento.. 2. Fungos filamentosos. 3. Hidrocarbonetos aromáticos. 4. Efluentes salinos. I.
Título.

CDD 628



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
Av. 13 de maio, 2081 - Bairro Benfica - CEP 60040-531 - Fortaleza - CE - www.ifce.edu.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Processo: 23256.014965/2025-40

Interessado: Camila Emanuelle Mendonça Viana

CAMILA EMANUELLE MENDONÇA VIANA

Desempenho de *Aspergillus niger* AN400 em meio salino na remoção de BTEX

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) Campus de Fortaleza, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em: 27/11/2025.

BANCA EXAMINADORA

Professora Titular Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa (orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Professor Dr. João Paulo da Silva Siqueira
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI)

Professora Titular Suzana Cláudia Silveira Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Documento assinado eletronicamente por **Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa, Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico**, em 27/11/2025, às 13:20, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Paulo da Silva Siqueira, Usuário Externo**, em 22/01/2026, às 16:38, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Suzana Cláudia Silveira Martins, Usuário Externo**, em 23/01/2026, às 09:23, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade do documento pode ser conferida no site https://sei.ifce.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0 informando o código verificador **8165917** e o código CRC **064CE787**.

A Deus.

Aos meus pais.

Aos mestres.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por me dar força, sabedoria e resiliência para enfrentar os desafios dessa jornada acadêmica.

Ao meu esposo, José Luís, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos dias mais difíceis. À minha filha, Alice, minha maior força e motivação de querer ser melhor a cada dia, que, com seu amor, tornou cada sacrifício mais leve e me deu ainda mais motivos para seguir em frente.

Aos meus pais, por serem minha base e me incentivarem desde sempre a buscar o conhecimento. O carinho e os valores que me transmitiram foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão, Emanuel, minha maior inspiração, orgulho e exemplo de força e resiliência.

À minha rede de apoio, composta por minha sogra, cunhados e sobrinhas, que estiveram ao meu lado, oferecendo suporte sempre que precisei.

À minha orientadora, Profa. Titular Kelly Rodrigues pela segurança e tranquilidade que sempre passava, suas orientações foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e profissional. Expresso minha sincera gratidão e admiração.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Victória Bermúdez, pela presteza e disponibilidade, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e esclarecer dúvidas. Sua orientação cuidadosa e incentivo constante foram um verdadeiro porto seguro ao longo deste processo acadêmico.

À Profa. Titular Glória Marinho, pelos valiosos ensinamentos, tanto acadêmicos quanto de vida. Sua dedicação e força são inspirações que levarei comigo sempre, servindo de exemplo dentro e fora do ambiente acadêmico.

A todos que fazem parte do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), meu sincero agradecimento pela colaboração, pelo espírito de equipe e pelas ricas trocas de experiências, que tanto contribuíram para meu aprendizado e para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço a Abdias, João Pedro, Lorena, Matheus, Débora e Valquíria, pela parceria e apoio ao longo dessa caminhada.

À gestão da EEEP Francisca Rocha Silva pela compreensão e incentivo, bem como aos amigos desta renomada escola, por tornarem essa jornada mais leve com seu companheirismo e apoio. A presença de vocês foi essencial para que eu enfrentasse os desafios desse percurso com mais motivação e alegria.

Aos professores que compuseram a banca examinadora, meu profundo agradecimento pela disponibilidade, pelas contribuições e sugestões valiosas que certamente agregarão ainda mais qualidade a este trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental (PGTGA).

Agradeço também ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP/CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero muito obrigada!

“O progresso não é feito por acaso. Ele resulta do trabalho combinado de muitos.”
(Alexander Graham Bell, 1890s)

RESUMO

A contaminação por hidrocarbonetos da indústria petroquímica é uma preocupação mundial, sendo a micorremediação uma tecnologia promissora. Neste estudo foi investigado o potencial do crescimento de *Aspergillus niger* AN400 em ambiente salino, na presença de BTEX. Em testes de halotolerância em placas de Petri, comparou-se seu crescimento em água do mar sintética ágar (ASW), Czapeck e *Sabouraud* com adição de NaCl (0‰, 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰, m/v). ASW recebeu glicose (0,5 e 5 g/L) e fonte de nitrogênio (0,02 g/L), extrato de levedura ou cloreto de amônio. A melhor resposta do crescimento das colônias foi em ASW com 0,5 g/L de glicose, com $2,96 \pm 0,03$ cm/dia e $2,17 \pm 0,26$ cm/dia, para extrato de levedura e cloreto de amônio, respectivamente. Adicionando-se BTEX (1200 µg/L e 4000 µg/L), nas mesmas condições, foram de $0,67 \pm 0,36$ cm/dia e $0,41 \pm 0,37$ cm/dia, nas placas com extrato de levedura, e $0,05 \pm 0,01$ cm/dia e $1,32 \pm 0,43$ cm/dia, respectivamente, nas placas com cloreto de amônio. Posteriormente, em reatores em batelada (200 mL) contendo meio aquoso com glicose (0,5 g/L) e cloreto de amônio (0,02 g/L), testou-se quatro condições: controle (RC), fungo sem cossubstrato (RF), fungo + glicose (RFG) e fungo + etanol (RFE), monitorando-se pH, fenóis, atividade de lacase, DQO bruta e filtrada ao longo de 120 h. *A. niger* apresentou metabolismo ativo no meio, com destaque para o estímulo diferenciado de enzimas oxidativas pelos cossubstratos. RFG apresentou maior remoção de fenóis (39,40%, 120 h) e atividade lacase máxima de 0,0040 U/L (48 h), enquanto em RFE, a maior atividade de lacase foi de 0,0520 U/L (24 h), com remoção máxima de fenóis de 30,87% (48 h). Ao final, não foram detectados BTEX nos reatores bióticos, exceto xilenos em RC. A diminuição da DQO filtrada e o aumento da DQO bruta, indicou indiretamente crescimento de biomassa nos reatores bióticos. A maior remoção de DQO filtrada nos reatores RF (87,40%), em 120 h, de modo que em RFG (31,25%) e RFE (19,87%), possivelmente, a menor remoção foi devido maior formação de EPS e outros metabólitos estimulados pela disponibilidade de glicose e etanol. Os dados apontam para o potencial da cepa *Aspergillus niger* AN400 para aplicação na biorremediação envolvendo condições salinas e presença de hidrocarbonetos aromáticos, recomendando-se otimização do processo em estudos futuros.

Palavras-chave: Biotratamento. Fungos filamentosos. Hidrocarbonetos aromáticos. Efluentes salinos.

ABSTRACT

Hydrocarbon contamination from the petrochemical industry is a global concern, and mycoremediation has emerged as a promising technology. This study investigated the growth potential of *Aspergillus niger* AN400 under saline conditions in the presence of BTEX. Halotolerance assays on Petri dishes compared colony growth in synthetic seawater agar (ASW), Czapek, and Sabouraud media supplemented with NaCl (0‰, 5‰, 10‰, 20‰, and 30‰, m/v). ASW was enriched with glucose (0.5 or 5 g/L) and nitrogen sources (0.02 g/L yeast extract or ammonium chloride). The best colony growth was observed in ASW with 0.5 g/L glucose, reaching 2.96 ± 0.03 cm/day and 2.17 ± 0.26 cm/day for yeast extract and ammonium chloride, respectively. With BTEX addition (1200 and 4000 $\mu\text{g/L}$), growth rates decreased to 0.67 ± 0.36 cm/day and 0.41 ± 0.37 cm/day in yeast extract plates, and 0.05 ± 0.01 cm/day and 1.32 ± 0.43 cm/day in ammonium chloride plates. Batch reactors (200 mL) containing ASW with glucose (0.5 g/L) and ammonium chloride (0.02 g/L) were then tested under four conditions: control (RC), fungus without co-substrate (RF), fungus + glucose (RFG), and fungus + ethanol (RFE). pH, phenols, laccase activity, and COD (total and filtered) were monitored for 120 h. *A. niger* maintained active metabolism, with co-substrates differentially stimulating oxidative enzymes. RFG showed the highest phenol removal (39.40% at 120 h) and maximum laccase activity of 0.0040 U/L (48 h), whereas RFE reached higher laccase activity (0.0520 U/L at 24 h) but lower phenol removal (30.87% at 48 h). At the end, BTEX were not detected in biotic reactors, except xylenes in RC. COD trends suggested biomass growth, with greater filtered COD removal in RF (87.40% at 120 h) compared to RFG (31.25%) and RFE (19.87%), likely due to increased EPS and secondary metabolites in the latter. Overall, the results demonstrate the potential of *A. niger* AN400 for bioremediation under saline conditions with aromatic hydrocarbons, although process optimization is recommended for future applications.

Keywords: Biotreatment. Filamentous fungi. Aromatic hydrocarbons. Saline effluents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Fórmula estrutural plana do Benzeno (a), Tolueno (b), Etilbenzeno (c) e isômeros do Xileno - "orto" (o) ", "meta" (m) e para" (p) (d).....	20
Figura 2 — Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa.....	32
Figura 3 — Placa com a cepa do fungo <i>Aspergillus niger</i> AN400 crescidos em meio de cultura Ágar <i>Sabouraud</i> Clorafenicol (a); Inóculo dos discos de micélios em meio de cultura (b).....	33
Figura 4 — Representação do teste de toxicidade para monitoramento do crescimento do fungo sob o efeito adverso da salinidade e na presença de BTEX.....	37
Figura 5 — Representação e descrição da batelada agitada.....	40
Figura 6 — Reatores em agitação na incubadora de bancada (shake).....	41
Figura 7 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro nos meios de cultura ASW com extrato de levedura (EL), nas salinidades de 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem salinidade (0‰), com glicose a 0,5 g/L (a) e 5 g/L (b).....	43
Figura 8 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro nos meios de cultura ASW com cloreto de amônio (CA), nas salinidades de 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem salinidade (0‰), com glicose a 0,5 g/L (a) e 5 g/L (b).....	47
Figura 9 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro no meio de cultura Czapek com adição de NaCl a 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem adição de NaCl (0‰).....	50
Figura 10 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro no meio de cultura <i>Saboraud</i> com adição de NaCl a 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem adição de NaCl (0‰).....	50
Figura 11 — Crescimento das colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN400, ao longo do tempo de cultivo, em meio de cultura ASW ELG 0,5, com concentração de 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX, como também no meio controle (sem BTEX) e no meio branco (ausência de salinidade e BTEX).....	52
Figura 12 — Crescimento das colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN400, ao longo do tempo de cultivo, em meio de cultura ASW CAG 0,5, com concentração de 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX, como também no meio controle (sem BTEX) e no meio branco (ausência de salinidade e BTEX).....	55
Figura 13 — Concentração relativa (C/Co) de DQO filtrada (a) e DQO bruta (b) nos grupos de reatores (RC, RF, RFG e RFE) em batelada no tempo 0 a 120h.....	57

Figura 14 — Atividade lacase registrada nos reatores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.....	60
Figura 15 — Comportamento da concentração de fenóis registrada nos reatores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.....	63
Figura 16 — Variação de pH registrada nos reatores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — % m/v dos compostos BTEX em gasolina comercial no Brasil.....	23
Tabela 2 — Caracterização da água produzida em plataformas de óleo e gás.....	24
Tabela 3 — Velocidades de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> no meio ASW EL variando salinidade e concentração de glicose	45
Tabela 4 — Velocidades de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> no meio ASW CA variando salinidade e concentração de glicose	48
Tabela 5 — Velocidades de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> nos meios Czapec e Sabouraud com variação nas concentrações de salinidade	50
Tabela 6 — Comparativo de velocidades médias de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> nos meios ASW EL e ASW CA na presença de concentração 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX e os respectivos desvios padrões.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Composição da Água do Mar Sintética (ASW) (g/L).	33
Quadro 2 — Componentes dos meios padrão Czapek e Agar Sabouraud Dextrose salinos.....	34
Quadro 3 — Quadro geral dos meios de cultivo e fontes nutricionais.....	34
Quadro 4 — Preparo da solução estoque de BTEX e suas concentrações nas placas de Petri.	35
Quadro 5 — Descrição da composição dos meios de cultivo em cada grupo do teste de toxicidade.....	36
Quadro 6 — Configuração e composição dos grupos de reatores (RC, RF, RFG, RFE).....	40

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASW	Água do mar sintética
ASW CAG	Água do mar sintética com cloreto de amônio e glicose
ASW ELG	Água do mar sintética com extrato de levedura e glicose
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
CA	Cloreto de Amônio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
EL	Extrato de Levedura
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
HSOW	Águas residuais de campos petrolíferos hipersalinos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis da
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
LATAM	Laboratório de Tecnologia Ambiental
LOQ	Limite de Quantificação
SMPs	Produtos Celulares Solúveis
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs
PW	Água produzida
VOCs	Compostos Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Contaminação de compostos orgânicos em meio aquático salino	18
3.2 Contaminação por BTEX	19
3.3 Gasolina e os efeitos do etanol e sua interação com os compostos BTEX.	21
3.4 Água Produzida (PW)	23
3.5 Tratamento biológico de águas residuárias salinas	25
3.6 Atividade enzimática de fungos filamentosos	29
3.7 Fontes de carbono e nitrogênio.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Cultivo do fungo <i>Aspergillus niger</i> AN400.....	32
4.2 Preparo dos meios de cultivo para o teste de halotolerância	33
4.3 Teste de Halotolerância.....	34
4.4 Preparo dos meios de cultivo para o teste de toxicidade a BTEX	35
4.5 Teste de toxicidade a BTEX.....	36
<i>4.5.1 Avaliação do crescimento micelial nas placas.....</i>	38
4.6 Análise estatística.....	38
4.7 Ensaio com reatores em batelada e biomassa dispersa para remoção de BTEX	39
<i>4.7.1 Preparo das cepas fúngicas.....</i>	39
<i>4.7.2 Constituição do meio sintético ASW.....</i>	39
<i>4.7.3 Montagem dos reatores em batelada com biomassa dispersa.....</i>	39
<i>4.7.4 Análises realizadas.....</i>	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43

5.1 Teste de Haloterância e avaliação de crescimento de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	43
5.2 Teste de Toxicidade com BTEX.	52
5.3 Ensaio com reatores em batelada e biomassa dispersa para remoção de BTEX	56
6 CONCLUSÃO.....	69
7 RECOMENDAÇÕES.....	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE.....	87

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por petróleo bruto continua a resultar na liberação de hidrocarbonetos no meio ambiente durante processos como extração, transporte, refino e armazenamento, contribuindo significativamente para a contaminação do solo e da água, influenciando negativamente a saúde pública (Johnston; Lim; Roh, 2019; Majeed; Shwan; Rashid, 2025).

Esses hidrocarbonetos formam uma mistura complexa de compostos orgânicos, incluindo alcanos, aromáticos, resinas e asfaltenos, dentre os quais se destacam benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEx), que, devido sua volatilidade e toxicidade, representam um risco significativo à segurança alimentar e à qualidade da água potável (Silas *et al.* 2020; Gomes *et al.* 2023).

Embora a infiltração natural de petróleo bruto seja milenar, estudos recentes demonstram que mais de 90% das manchas de óleo crônicas nos oceanos são resultantes de atividades humanas, como vazamentos de navios, plataformas e escoamento urbano, evidenciando o impacto significativo das ações antropogênicas na poluição marinha (Dong *et al.* 2022). Em 2023, o consumo global de petróleo atingiu aproximadamente 4,53 bilhões de toneladas métricas, representando um aumento de 2,45% em relação ao ano anterior. Esse crescimento contínuo reflete a dependência significativa da economia mundial em relação ao petróleo e seus derivados. Consequentemente, derramamentos acidentais ao longo da cadeia produtiva tornam-se inevitáveis, destacando a necessidade de práticas mais sustentáveis e seguras no setor (STATISTA, 2024).

Apesar de processos naturais como evaporação, dissolução, foto-oxidação e emulsificação contribuírem para a atenuação de hidrocarbonetos, apenas a biodegradação microbiana é capaz de promover a mineralização completa dessas moléculas — convertendo frações orgânicas complexas em dióxido de carbono, água e biomassa e, assim, encerrando seu ciclo como poluentes ambientais. Revisões e estudos recentes demonstram que microrganismos especializados ativam vias catabólicas específicas e redes enzimáticas que permitem a oxidação completa de frações alifáticas e aromáticas, enquanto processos abióticos frequentemente levam apenas à transformação parcial ou redistribuição do contaminante no ambiente. Essas diferenças fundamentam a importância da biorremediação como estratégia primária para atenuação de hidrocarbonetos em meios aquáticos e terrestres (Ławniczak *et al.* 2020; Rabus e Wilkes, 2020; Mekonnen; Aragaw; Genet, 2024).

Diversos microrganismos possuem a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos como fonte de energia (Prince, 2019; Prince; Amande; Mcgenity, 2019), dentre eles, os fungos apresentam resistência a condições ambientais adversas e à produção de enzimas extracelulares, como lacases, peroxidases e oxidoredutases, que facilitam a degradação de compostos orgânicos complexos (Akhtar; Mannan, 2020; Vaksmaa *et al.* 2023; Da Silva *et al.* 2023; Dinakarkumar *et al.* 2024). Dentro desse grupo, *Aspergillus niger* destaca-se pela ampla distribuição em ambientes naturais e por sua tolerância a variações extremas de temperatura e pH, podendo crescer entre $< 3,5$ a valores $> 9,0$, evidenciando grande amplitude de tolerância ao pH. Além disso, estudos contemporâneos documentam sua capacidade de crescer e reproduzir-se em uma ampla faixa térmica, tipicamente relatada na literatura entre 6 e 47 °C (Zakaria, 2024; Thegarathah *et al.* 2024; Šimonovičová *et al.* 2025).

Apesar dos avanços no estudo da biodegradação de hidrocarbonetos, os mecanismos envolvidos nesse processo em ambientes salinos ainda permanecem pouco explorados. Essa lacuna é especialmente relevante porque muitos despejos industriais e efluentes contaminados com BTEX apresentam alta salinidade, como a água produzida na extração de petróleo e efluentes da indústria petroquímica. Além disso, o próprio ambiente marinho pode ser impactado por derramamentos de petróleo e derivados, tornando necessária a busca por microrganismos halotolerantes capazes de atuar nessas condições. Estudos recentes reforçam essa necessidade, destacando que a biodegradação em meios salinos ainda enfrenta desafios significativos, mas que espécies halotolerantes, como fungos do gênero *Aspergillus*, apresentam grande potencial de aplicação (Jimoh; Ikimiukor; Adeleke, 2022; Rodrigues *et al.* 2025).

Embora estudos anteriores tenham avaliado a tolerância de *Aspergillus niger* à salinidade, há escassez de dados quanto à expressão enzimática e a remoção de BTEX, de modo que é importante avaliar se *Aspergillus niger* AN400 mantém atividade metabólica e degradativa de BTEX em condição salina. Espera-se ampliar o conhecimento sobre a atuação de microrganismos fúngicos em condições adversas, como ambientes salinos, que impõem desafios aos processos biotecnológicos de tratamento de efluentes. Assim, será investigada a viabilidade do uso de *A. niger* AN400 em estratégias de biorremediação, a partir de meio salino sintético contendo BTEX, com vistas a subsidiar soluções aplicáveis à descontaminação de águas salinas impactadas por hidrocarbonetos, seja em efluentes de indústrias de beneficiamento de petróleo, na água produzida durante sua extração ou em ecossistemas costeiros sujeitos a atividades petrolíferas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial de *Aspergillus niger* AN400 na remoção de compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), como fonte única ou suplementar de carbono em meio salino.

2.2 Específicos

- ✓ Verificar a capacidade de *Aspergillus niger* AN400 de crescer em meio salino em diferentes concentrações de NaCl;
- ✓ Comparar o crescimento da cepa fúngica em meios salinos e não salinos, na presença e ausência de BTEX;
- ✓ Avaliar a influência da presença de fonte primária de carbono na remoção dos BTEX pelo microrganismo;
- ✓ Verificar a remoção de BTEX em reatores biológicos em batelada inoculados com o fungo;
- ✓ Monitorar a concentração de fenóis e a atividade enzimática de lacase;
- ✓ Comparar o efeito da presença de glicose e etanol na remoção de fenóis, BTEX e na atividade enzimática.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Contaminação de compostos orgânicos em meio aquático salino

A intensificação das atividades industriais e urbanas nas últimas décadas tem promovido a introdução de diversos contaminantes orgânicos nos ecossistemas aquáticos, tanto continentais quanto marinhos. Dentre esses contaminantes, destacam-se os hidrocarbonetos derivados do petróleo, amplamente utilizados como fonte de energia e matéria-prima em diversas cadeias produtivas (Al-Ghouti *et al.* 2019).

O petróleo bruto e seus derivados, quando acidentalmente liberados no meio ambiente, podem causar impactos significativos na biota aquática e nos recursos hídricos. Esse risco é amplificado devido à sua alta mobilidade, persistência e toxicidade (Neff, 2002).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2013), o petróleo é um recurso fóssil de origem natural, inflamável e de elevado valor energético. Apresenta coloração variável (do incolor ao preto), densidade geralmente inferior à da água e odor característico. Sua extração pode ocorrer tanto em ambientes terrestres (*onshore*) quanto marinhos (*offshore*), sendo a prospecção e posterior exploração comercial processos que exigem anos de planejamento e investimentos elevados, os quais aumentam conforme a profundidade e a complexidade geológica dos reservatórios.

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo, muitos deles considerados compostos recalcitrantes, são classificados como poluentes prioritários por sua persistência no ambiente e pelos riscos que oferecem à saúde humana e aos ecossistemas (Costa *et al.* 2012; ATSDR, 2011). A liberação desses contaminantes ocorre, principalmente, por meio de atividades antrópicas como o descarte inadequado de efluentes industriais e urbanos, vazamentos durante operações da indústria petrolífera e acidentes ambientais envolvendo derramamento de óleo, como evidenciado por diversos acidentes ambientais ao redor do mundo. Um dos maiores foi o derramamento da plataforma Deepwater Horizon, no Golfo do México, em 2010, com liberação de aproximadamente 4,9 milhões de barris de petróleo no mar (McNutt *et al.* 2012).

Outros casos incluem o acidente com o Hebei Spirit (2007), na Coreia do Sul; Tasman Spirit (2003), no Paquistão; Sea Empress (1996) e MV Braes (1993), ambos no Reino Unido; e Exxon Valdez (1989), no Alasca, Estados Unidos (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, 2011). Além disso, a destruição do Delta do Níger, na

Nigéria, resultante de mais de vinte anos de derramamento de óleo e extração descontrolada, é outro exemplo significativo de contaminação ambiental (Kwok *et al.* 2019).

No contexto brasileiro, destaca-se o desastre de 2019, considerado um dos mais graves envolvendo petróleo. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2019), aproximadamente 4.334 km da costa das regiões Nordeste e Sudeste foram afetados, abrangendo 11 estados, 120 municípios e 724 localidades. Esse evento evidenciou a vulnerabilidade dos ecossistemas costeiros e marinhos à contaminação por derivados do petróleo.

Entre os compostos presentes no petróleo, os hidrocarbonetos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são particularmente preocupantes, tanto pela sua toxicidade quanto pela facilidade com que se difundem no ambiente aquático e nos aquíferos subterrâneos (ATSDR, 2007). Estudos realizados em diferentes regiões do Brasil indicam ampla variação na concentração de BTEX em águas subterrâneas. Em Natal (RN), valores variaram entre 0,2 e 185,7 µg/L (Santos *et al.* 2018), enquanto em áreas próximas a postos de combustíveis em Santa Catarina, foram registradas concentrações de até 4.470 µg/L (Silva *et al.* 2019). Em casos extremos, como em São Paulo, valores superiores a 20.000 µg/L foram relatados (Ferreira *et al.* 2020), indicando a necessidade de tratamento para garantir a segurança da utilização desses recursos hídricos.

3.2 Contaminação por BTEX

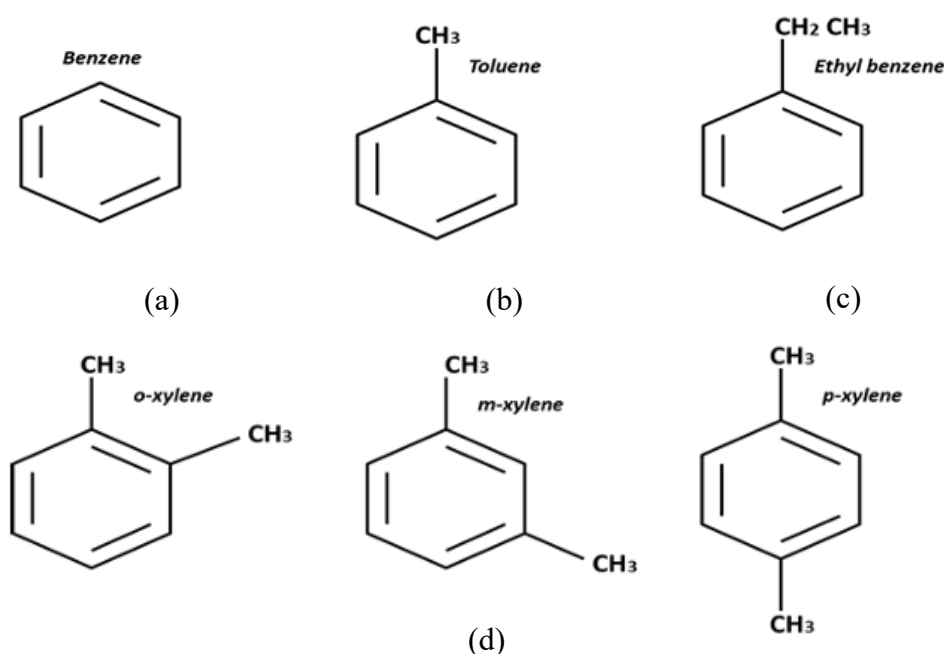
Os compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são hidrocarbonetos monoaromáticos derivados do petróleo, com estrutura baseada no anel benzênico — uma das unidades mais estáveis da química orgânica (Andrade *et al.* 2010).

Essa estrutura confere aos BTEX alta volatilidade, baixa solubilidade em água e grande afinidade por lipídios, características que influenciam diretamente sua toxicidade e comportamento ambiental. O benzeno é composto por seis átomos de carbono e seis átomos de hidrogênio sendo que cada átomo de carbono está ligado a dois carbonos e a um hidrogênio, formando uma estrutura de ressonância. O anel benzênico é uma das unidades estruturais orgânicas mais estáveis (Baird, 2002). A sua fórmula estrutural plana está representada na 1ª Figura. Já a estrutura molecular do tolueno é constituída por um anel benzênico metilado monossustituído, sendo considerado o componente de maior quantidade em ambientes contaminados por BTEX (Baird, 2002) (Figura 1b).

O etilbenzeno é o derivado etilado do benzeno, para sua formação ocorre o rompimento de uma ligação carbono e a substituição do hidrogênio por um grupo etila C_2H_5 (Godambe; Fulekar, 2017) (Figura 1c).

Por fim, o terceiro grupo componente dos BTEX, os xilenos, são formados por compostos que possuem um anel aromático com o hidrogênio substituído por dois grupos metila (Baird, 2002). Para descrever suas posições relativas quando existirem dois substituintes no anel benzênico usa-se as palavras “orto” (o) quando os dois substituídos estão ligados em carbono adjacentes, “meta” (m) quando os substituintes estão separados por um átomo de carbono não substituído e “para” (p) quando separados por dois carbonos não substituídos (Godambe; Fulekar, 2017) (Figura 1d).

Figura 1 — Fórmula estrutural plana do Benzeno (a), Tolueno (b), Etilbenzeno (c) e isômeros do Xileno - "orto" (o) ", "meta" (m) e para" (p)



Fonte: Godambe; Fulekar, (2017).

Como os compostos BTEX são caracterizados por sua lipossolubilidade e volatilidade, sua inalação e absorção pelos tecidos adiposos do organismo representam um grande problema no mundo, pois são extremamente perigosas quando liberadas no ambiente, tanto para os corpos d'água superficiais quanto os subterrâneos, e tóxicos aos seres humanos, agindo como depressores do Sistema Nervoso Central (SNC), causar câncer, e algumas hematopatologias (Andrade *et al.* 2010).

Diversos autores recentes têm descrito os efeitos tóxicos específicos dos compostos BTEX. O benzeno continua sendo classificado como agente carcinogênico e mutagênico, causando danos genéticos e hematológicos mesmo em exposições de baixa intensidade (Li *et al.* 2024b; ATSDR, 2007). O tolueno tem demonstrado efeitos neurológicos como tontura, dor de cabeça, alterações motoras e de coordenação, especialmente em exposições prolongadas ou conjuntas com outros compostos aromáticos (Santurtún *et al.* 2024). Etilbenzeno foi associado a irritações nas vias respiratórias, alterações hepáticas e possíveis efeitos cognitivos, enquanto os xilenos mostram evidências recentes de disfunção cognitiva, atrasos no tempo de reação, perda de memória e impactos no desenvolvimento neural, particularmente em exposições pré-natais ou ocupacionais (Han *et al.* 2025; Hashemi *et al.* 2025).

Esses efeitos reforçam a necessidade de monitoramento rigoroso da presença desses compostos em ambientes aquáticos e ocupacionais uma vez que podem se acumular nos organismos aquáticos por bioacumulação, conforme estudo conduzido por Akinsanya *et al.* (2019) demonstrando que peixes da espécie *Heterotis niloticus* apresentaram concentrações de BTEX significativamente maiores em seus tecidos do que na água onde habitavam, evidenciando o risco de transferência trófica e de exposição indireta à fauna e ao ser humano. Além disso, Doherty *et al.* (2019) relataram alterações histopatológicas significativas em *Clarias gariepinus* expostos a BTEX, incluindo necrose branquial, inflamações hepáticas e alterações gonadais, confirmando o uso dessas espécies como bons biomarcadores ambientais, ou seja, evidências de respostas biológicas observáveis e específicas, como mudanças histopatológicas (Van der Oost *et al.* 2003) e enzimáticas (Abdallah *et al.* 2024).

3.3 Gasolina e os efeitos do etanol e sua interação com os compostos BTEX.

A gasolina é um dos derivados do petróleo mais requisitados no mundo. É uma mistura complexa de hidrocarbonetos que tem ponto de ebulição variável entre 30° e 225° Celsius, envolvendo mais de 1.200 compostos de carbono dentre estes os aromáticos (Hilsdorf, 2004). Nas últimas décadas, em virtude da escassez do petróleo e do excesso de monóxido de carbono no ar atmosférico nos grandes centros urbanos, alguns países, entre eles o Brasil, passaram a utilizar como combustível alternativo uma mistura de álcool e gasolina. No Brasil, esta mistura corresponde a 22% de etanol e 78% de gasolina, diferenciando-a da gasolina comercializada em outros países, pois as interações entre o

etanol e os BTEX causam um efeito diferente no deslocamento da pluma de contaminantes em relação ao observado em países que utilizam gasolina pura. Os BTEX são miscíveis nos álcoois primários (metanol e etanol); estes são altamente solúveis em água. Quando a mistura gasolina-etanol entra em contato com a água, o etanol passa para a fase aquosa aumentando a solubilidade dos BTEX nesta fase. Este processo é denominado de cossolvência, definido como a capacidade de um determinado solvente em aumentar a solubilidade de um soluto em outro solvente (Milavec, *et al.* 2019).

Estudos recentes confirmam que, em sistemas subsuperficiais, a presença de etanol em misturas gasolina-etanol altera de forma relevante o destino dos compostos BTEX: o etanol, por atuar como co-solvente, eleva a solubilidade aquosa dos aromáticos, favorecendo uma maior fração dissolvida e, conseqüentemente, aumentando a mobilidade e extensão das plumas de BTEX em aquíferos (ARB, 2020; Schneider *et al.* 2024). Além disso, a rápida oxidação do etanol consome aceptores de elétrons (O_2 , nitrato, sulfato), podendo retardar a mineralização dos BTEX por competição por recursos e mudança da comunidade microbiana, o que tende a aumentar a persistência dos aromáticos enquanto o etanol estiver presente em concentrações elevadas (Li *et al.* 2024.). Em estudos experimentais e de campo recentes, plumas originadas de derrames de gasolina com alto teor de etanol apresentaram maior dissolução inicial de BTEX e maior extensão de migração em comparação com derrames sem etanol, corroborando que o etanol frequentemente se encontra em maiores concentrações que os BTEX na fase aquosa e conduz a mobilidade relativa maior do solvente (ARB, 2020). Sendo assim, a adição de etanol à gasolina aumenta o risco de contaminação ambiental por BTEX. O etanol atua como um cossolvente, aumentando a solubilidade dos BTEX em água e, conseqüentemente, facilitando sua migração no ambiente. Essa maior mobilidade dos BTEX eleva o potencial de contaminação de águas subterrâneas, bioacumulação em organismos e persistência no meio ambiente, representando um perigo maior para os ecossistemas aquáticos e terrestres.

Para garantir a qualidade dos combustíveis, a ANP (Agência Nacional do Petróleo) estabelece especificações máximas e mínimas de características do combustível conforme a Resolução ANP nº. 40, de 25/10/2013, no máximo, 1 e 35% (m/v) de benzeno e compostos aromáticos, respectivamente (BRASIL, 2013). Embora a resolução não especifique limites individuais para tolueno, etilbenzeno e xilenos, esses compostos estão incluídos no limite total de 35% para aromáticos.

Os autores Silva *et al.* (2018) coletaram 30 amostras de 4 regiões diferentes do Estado do Maranhão, sendo elas gasolina comum e/ou aditivada e foi possível verificar que

o combustível comercializado no estado, também se situa abaixo do limite da resolução, conforme Tabela 1.

Tabela 1 — % m/v dos compostos BTEX em gasolina comercial no Brasil.

Fonte	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xilenos
Silva <i>et al.</i> (2018)	0,372	1,533	-	1,487
ANP, EPE (2023)	$\leq 1,0$	-	-	-
Chira <i>et al.</i> (2024)	0,5 – 3,0	1,5 – 26,0	0,5 – 11,0	1,0 – 31,0
Anigilaje <i>et al.</i> (2024)	0,3 – 2,0	1,5 – 10,0	0,5 – 4,0	1,0 – 12,0

Fonte: Autora (2025).

3.4 Água Produzida

Além do comprovado potencial tóxico dos compostos BTEX, está bem documentado que os reservatórios de petróleo e gás contêm, naturalmente, água salina que é produzida em grande volume durante a extração – a chamada “*produced water*” (PW). Na literatura é mencionado que a composição da PW é altamente variável conforme a formação geológica e a localidade, mas frequentemente apresenta altos teores de sólidos dissolvidos (TDS), com salinidades que podem variar de níveis comparáveis à água do mar até várias vezes a salinidade marinha, bem como elevadas concentrações de hidrocarbonetos voláteis (BTEX), compostos semi-voláteis e metais (Abdelhamid *et al.* 2024; Rajbongshi; Gogoi, 2024).

Relatórios técnicos e levantamentos de produção também documentam que grandes volumes de água são gerados junto com petróleo e gás em operações convencionais e não convencionais (GWPC, 2021; U.S. DOE, 2024), tornando o manejo e o tratamento da PW um dos principais desafios ambientais e logísticos da indústria. Além disso, avaliações toxicológicas recentes sinalizam que a elevada salinidade e a mistura complexa de contaminantes tornam a PW um efluente ambientalmente sensível, exigindo tratamentos específicos antes de descarte ou reuso (Hu *et al.* 2022; Khlaifat *et al.* 2023).

Na Tabela 2 estão resumidas as características das águas produzidas em plataformas de petróleo e gás nas regiões sudeste (21 plataformas), nordeste (1 plataforma), e sul (1 plataforma) do Brasil realizada por Gabardo (2007).

Al-Ghouti *et al.* (2019) estimaram que cerca de 50 bilhões de barris de petróleo foram produzidos em todo o mundo por ano, e o volume de águas residuais de campos petrolíferos hipersalinos (HSOW) foi cerca de 10 vezes maior do que a produção de petróleo. Kim *et al.* (2020) destacaram que essas águas residuais não só contêm uma alta proporção de compostos orgânicos complexos, como, por exemplo, hidrocarbonetos

aromáticos, benzeno e fenólicos, mas também dissolve grandes quantidades de sais, com baixa biodegradabilidade.

Tabela 2 — Caracterização da água produzida em plataformas de óleo e gás.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Mediana
Sulfato (mg/L)	17	2243	481
Sulfeto (mg/L) ^a	-	-	10
Bicarbonato (mg/L)	275	730	436
Nitrogênio Amoniacal (mg/L)	10 ^a	300 ^a	51,7
pH	6,06	8,2	6,98
Salinidade (mg/L)	38.182	179.766	75.434
BTEX			
Benzeno (mg/L)	0,625	13,462	1,579
Tolueno (mg/L)	0,484	5,066	2,11
Etilbenzeno (mg/L)	0,051	0,602	0,223
Xilenos (mg/L)	0,237	3,904	0,971
Fenóis (mg/L)	0,05	5,74	0,74
Ácidos			
Acético (mg/L)	45	775	365
Propiônico (mg/L)	21	200	47
Metais			
Alumínio (mg/L)	0,003	0,32	0,1
Bário (mg/L)	0,2	45	2
Boro (mg/L)	18,4	80,1	36,4
Cobre (mg/L)	0,01	0,29	0,12
Ferro (mg/L)	0,1	17	1,1
Fósforo (mg/L)	0,1	3	0,05
Mangânes (mg/L)	0,04	5,89	0,35

Fonte: adaptado Gabardo (2007); a Ahmadun *et al.* (2009); b Vieira *et al.* (2003).

Devido à existência dos componentes complexos na HSWO sua descarga sem o tratamento adequado poderia causar grandes danos ao ecossistema e à saúde humana. Assim, o grande volume de HSOW deve ser tratado de forma eficaz e adequada (Cao *et al.* 2022).

Sendo assim, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de metodologias eficientes que sejam capazes de minimizar ou eliminar o efeito nocivo desses compostos. Os métodos convencionais de tratamento, como absorção, adsorção, combustão e condensação, sofrem com diversos inconvenientes, incluindo altos custos de capital, operação e

manutenção, alto aporte energético, dificuldade no manuseio de poluentes de baixa concentração e produção de subprodutos tóxicos. No entanto, tecnologias de tratamento ambientalmente amigável, econômica e fácil de operar, como o tratamento biológico, poderia superar as limitações de outros processos no tratamento de HSOW (El-naas; Acio; Telib, 2014).

3.5 Tratamento biológico de águas residuárias salinas

Os processos de tratamento biológico exploram a capacidade metabólica intrínseca dos microrganismos para transformar, mineralizar ou imobilizar poluentes ambientais, convertendo frações orgânicas em biomassa microbiana, dióxido de carbono e água, ou em produtos menos tóxicos. Além da efetiva remoção de contaminantes orgânicos, na literatura, são destacadas vantagens operacionais dos processos biológicos, tais como menor consumo energético e de reagentes químicos, menor geração de subprodutos perigosos e custo operacional geralmente inferior em cenários de grandes vazões e baixas concentrações de contaminantes, condições nas quais processos físico-químicos, como absorção, adsorção, combustão, condensação, por exemplo, tornam-se menos econômicos ou eficientes (El-naas; Acio; Telib, 2014).

Ademais, tecnologias biológicas modernas, como biofiltração, reatores com biofilme, bioreatores de alta taxa e o uso de consórcios microbianos otimizados, têm demonstrado elevada remoção de VOCs e hidrocarbonetos em ensaios de bancada e aplicações de campo, reforçando seu papel como alternativa sustentável para tratamento de águas e efluentes contaminados (Bala *et al.* 2022; Pachaiappan *et al.* 2022; Sravan *et al.* 2024; Ayach *et al.* 2024).

Os princípios clássicos de biorremediação são a existência de microrganismos com capacidade metabólica especializada para degradar ou transformar os contaminantes; disponibilidade do poluente de forma acessível, isto é, biodisponibilidade, sem que esteja fortemente sorvido ou inacessível e condições ambientais favoráveis que permitam crescimento e atividade microbiana, como temperatura, pH, oxigênio ou aceptadores de elétrons, nutrientes, salinidade (Bhowmick *et al.* 2024).

No trabalho de Dinakarkumar *et al.* (2024), os autores destacaram que fungos como *Aspergillus niger* ou *Pleurotus ostreatus* só alcançam percentuais de degradação relevantes quando o contaminante está dissolvido ou disperso de modo bioacessível, e que a salinidade

ou pH fora da faixa ótima para esses microrganismos reduzem fortemente a expressão enzimática, especialmente, de enzimas oxidativas.

De maneira semelhante, Elshafei e Mansour (2024), observaram que, embora o solo contenha comunidades microbianas capazes, se o contaminante estiver fortemente ligado aos sólidos ou se faltar oxigênio/níveis de nutrientes, a degradação é muito lenta. Sendo assim, em condições ambientais de salinidade pode ocorrer o comprometimento da eficiência do processo de biodegradação, como reportado por Rodrigues *et al.* (2025) que constataram que *A. niger* submetido a salinidades de 2 a 30‰ (2 a 30 g/L), verificaram que a cepa utilizada foi tolerante à salinidade de até 25‰, crescendo e degradando os BTEX. Contudo, aqueles autores também reportaram que houve diminuição decrescente da eficiência de remoção desses compostos nos valores mais elevados de salinidade.

É importante observar que os microrganismos em ambientes com alta salinidade devem lidar não apenas com altas concentrações de íons sal, mas também com pH elevado, teor baixo de oxigênio, altas e baixas temperaturas, íons de metais pesados e outros produtos químicos tóxicos (Somee *et al.* 2021). Segundo Khemili-Talbi *et al.* (2015), a biorremediação de ambientes extremos exige organismos que sejam adaptados a esses habitats, denominados organismos extremófilos, que têm um papel crucial na biorremediação desses locais. Os extremófilos auxiliam na biorremediação, que é a limpeza de ambientes contaminados e poluídos, por meio de processos que incluem transformação, imobilização ou degradação de contaminantes ou poluentes em substâncias não tóxicas por biodegradação, bioissorção, bioemulsificação, biorredução etc. (Marques, 2018; Donati *et al.* 2019; Jeong e Choi, 2020).

Sabe-se que a capacidade degradativa dos microrganismos frente aos poluentes diminui em condições de alta salinidade, mas o uso de microrganismos halofílicos ou halotolerantes pode superar essas limitações (Zhuang *et al.* 2010). A biodegradação de compostos orgânicos em ambientes salinos foi relatada precocemente por Oren *et al.* (1992), mas a maioria dos relatos sobre esta questão concentrou-se em componentes de hidrocarbonetos alifáticos do petróleo. Recentemente, tem havido um interesse renovado no controle da poluição utilizando microrganismos extremofílicos, provavelmente devido aos crescentes problemas de poluição e seu impacto na saúde humana em todo o mundo.

Organismos halofílicos e halotolerantes diferem quanto às suas exigências e tolerâncias ao sal, o que define sua aplicabilidade em processos biotecnológicos e de biorremediação em ambientes salinos. A classificação mais utilizada considera a concentração ótima de NaCl para o crescimento microbiano, de 1 a 5%, para halófilos

ligeiros, de 5 a 20%, para halófilos moderados e de 20 a 30%, para os extremos. Já os halotolerantes não necessitam de sal, mas suportam aumentos significativos de salinidade. Essas categorias refletem diferentes estratégias adaptativas, como o acúmulo de solutos compatíveis ou a adaptação do proteoma ao modelo “*salt-in*”, e têm orientado estudos que avaliam a viabilidade de microrganismos no tratamento de efluentes salinos e na degradação de hidrocarbonetos em condições hipersalinas (Dutta; Bandopadhyay, 2022; Yoo *et al.* 2023; Oren, 2024).

Os halófilos desenvolveram várias adaptações para prosperar em ambientes altamente salinos, pois o sal atua como um elemento-chave na alteração da solubilidade, estabilidade e conformação da proteína (Mokashe; Chaudhari; Patil, 2018). A pressão osmótica dentro da célula é mantida impedindo a entrada de sal inorgânico, bem como sintetizando osmólitos orgânicos (Raval; Bhatt; Singh, 2018).

Em regiões de altíssimas concentrações de sal ($> 0,1$ mol/L), sal e água formam uma rede iônica, o que, por sua vez, reduz a disponibilidade de água para proteínas internas (Basak; Biswas; Bhattacharyya, 2020). Assim, devido à desidratação, a interação entre os aminoácidos hidrofóbicos aumenta e eles formam agregados. As proteínas halofílicas são únicas e têm uma ponte salina relativamente maior quando comparadas às proteínas encontradas em condições normais, por exemplo, proteína P45 (protegem a desnaturação, resistem à desativação da malato desidrogenase), proteína ligadora de transcrição (TBP) e proteína de ligação à caixa de TATA (interação aprimorada com DNA) (Kumar *et al.* 2018). Outras adaptações incluem aumento de resíduos ácidos, diminuição de resíduos hidrofóbicos, dobramento dependente de sal, inserções de peptídeos halofílicos, etc. (Reed *et al.* 2013).

Os microrganismos halofílicos podem produzir mais células hidrofóbicas, o que melhora sua capacidade de se ligar ao petróleo bruto (McGenity *et al.* 2012). O micróbio halofílico é uma abordagem prospectiva para a purificação de águas residuais industriais com altos níveis de sais inorgânicos, bem como contaminantes orgânicos (Passante *et al.* 2022). Portanto, microrganismos halofílicos e halotolerantes têm gradualmente desenvolvido estruturas, fisiologias e genomas únicos para a sobrevivência nessas condições ambientais adversas. Os tipos especiais de genes, mecanismos fisiológicos e metabólitos de microrganismos halofílicos e halotolerantes têm significativo valor de aplicação, o que pode facilitar novos métodos biotecnológicos e promover o desenvolvimento biotecnológico e o uso de recursos microbianos de ambientes com alto teor de sal (Edbeib; Wahab; Huyop, 2016). Em seus estudos, Zhan *et al.* (2021), relataram que a tolerância dos microrganismos à

alta salinidade pode ser devida à adaptação metabólica, que aplica duas estratégias para equilibrar o potencial osmótico. Uma delas é descarregar seletivamente solutos (por exemplo, sódio e cloro). A outra é produzir matéria orgânica (por exemplo, sacarose e aminoácidos) nas células para manter o equilíbrio osmótico intracelular e extracelular.

Estudos recentes confirmaram que a aclimação gradual e a seleção de comunidades halotolerantes permitem recuperar parte do desempenho biológico em reatores salinos, de modo que estratégias de aumento lento da salinidade (*osmotic priming* / *stepwise increase*) e o uso de inóculos pré-aclimatados têm mostrado viabilizar a adaptação de comunidades nitrificantes e de lodo granular aeróbio, reduzindo a perda de atividade que ocorreria em transferências por choque e permitindo operação estável após semanas a meses de adaptação (Navada *et al.* 2020; Sarosh; Ramaswami, 2025)

Além disso, revisões contemporâneas demonstraram que a adoção de microrganismos especializados, halófilos ou halotolerantes, é, frequentemente, a solução mais robusta para tratamento biológico de efluentes de alta salinidade, pois esses organismos empregam estratégias osmoadaptativas, com a acumulação de solutos compatíveis ou “*salt-in*”, que preservam atividade enzimática em condições salinas extremas. Assim, a prática de aclimar microrganismos por incremento gradual de salinidade ou, quando viável, implantar comunidades halófilas, representa hoje a abordagem aceita para manter eficiência no tratamento biológico de águas residuárias salinas (Navada; Vadstein, 2022; Paulo *et al.* 2024; Mainka *et al.* 2021; Dutta & Bandopadhyay, 2022).

Estudo desenvolvido por Cao *et al.* (2022) sobre a remoção eficiente de poluentes e flexibilidade microbiana sob alto gradiente salino de um sistema de tratamento de águas residuárias de campos petrolíferos, revelou que em relação ao perfil da comunidade fúngica, todos os gêneros de fungos pertenciam a três filos principais: *Rozellomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. *Ascomycota* foi um filo fúngico amplamente distribuído no ambiente com a maioria das espécies, e estudos recentes indicam que membros do filo *Ascomycota* podem desempenhar papel importante na degradação de hidrocarbonetos de óleo recalcitrantes; por exemplo, isolados de *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Alternaria* e *Aspergillus* têm demonstrado capacidade de degradar tanto frações saturadas quanto PAHs, alcançando reduções superiores a 70-90% em diversas condições experimentais (Hamad *et al.* 2021; De La Cruz-Izquierdo *et al.* 2021; Silva Monteiro *et al.* 2024).

Organismos extremófilos e extremotolerantes continuam emergindo na literatura recente como opções promissoras para biorremediação em condições adversas (alta salinidade, pH extremo, solventes, temperaturas não ideais). Fungos filamentosos halofílicos

demonstram manter atividade enzimática funcional em salinidades elevadas, suportar estresse osmótico e produzir enzimas adaptadas a essas condições (Hmad; Gargouri 2024). O levedo negro *Exophiala dermatitidis* mostrou capacidade de crescimento em até ~17% de NaCl, pH variando de 2.5 a 12.5 e repertório genômico para degradar compostos aromáticos em ambientes estressantes (De León *et al.* 2025). Revisões recentes indicam que microrganismos especializados (halofílicos ou halotolerantes), bem como suas extremozimas, são mais robustos frente a compostos xenobióticos, solventes orgânicos e agentes desnaturantes, oferecendo versatilidade maior para recuperação ambiental em ambientes poluídos (Wang *et al.* 2023; Kikani *et al.* 2023).

Eles funcionam como biocatalisadores nas indústrias de alimentos, detergentes, celulose e papel. Algumas extremozimas como celulasas, proteases, lipases, esterases, catalases, queratinases, peroxidases, etc. têm uma grande variedade de aplicações em diversas indústrias (Drioli e Giorno, 2018). As extremozimas produzidas por esses microrganismos atuam como biocatalisadores, catalisando e ajudando a insolubilização e precipitação de poluentes, catalisando reações redox e minimizando a produção de poluentes secundários (Ahmed *et al.* 2018; Marques, 2018; Jeong e Choi, 2020).

3.6 Atividade enzimática de fungos filamentosos

Muitos fungos filamentosos têm sido relatados como agentes de biorremediação devido às suas redes miceliais versas e atividades secretoras de enzimas. A maioria dos fungos produz enzimas de alto potencial redox, como a manganês peroxidase (MnP), lacases (Lac) e lignina peroxidases (LiP) para a oxidação da lignina. Essas enzimas geralmente não são substrato-específicas, pois podem oxidar uma ampla gama de xenobióticos, incluindo pesticidas, plásticos e hidrocarbonetos (Asemoloye *et al.* 2020; Daccò *et al.* 2020).

Estudos recentes reportam que espécies de *Aspergillus* são as mais ativas na degradação de petróleo bruto e derivados, incluindo cepas capazes de tolerar óleo pesado, degradar frações recalcitrantes como resinas e asfáltênicos, e expressar múltiplas enzimas como lacase, peroxidase, lignina peroxidase, entre outras (Al-Zaban; Alharbi; Mahmoud, 2021).

De fato, Alharbi *et al.* (2022) mostraram que *Aspergillus terreus* ativou genes de lacase durante a biodegradação de óleo bruto, assim como Asemoloye *et al.* (2017) que encontraram a presença dos genes da lacase e da peroxidase em *Aspergillus niger*. Aqueles autores correlacionaram suas expressões com a degradação de hidrocarbonetos do petróleo

bruto leve da Nigéria. Em outro estudo, Asemoloye *et al.* (2020) isolaram *Aspergillus flavus* da rizosfera e observou tolerância da espécie ao óleo cru, com a expressão de genes de Lac, LiP, MnP e celulase.

A. flavus e *A. niger* são mencionados na degradação de óleo pesado, como nos trabalhos de Zhang, Feng e Ren (2024) e de Cáceres-Zambrano *et al.* (2024), que associaram a degradação de frações pesadas, reforma do óleo e redução de viscosidade às suas atividades enzimáticas.

Sendo assim, a utilização do gênero fúngico *Aspergillus* ao meio salino pode ter um potencial degradador de hidrocarbonetos de petróleo bruto, como os BTEX em ambientes salinos, como a água do mar e alguns efluentes salinos. Alguns fatores, no entanto, são essenciais para proporcionar o crescimento e desenvolvimento de fungos, como por exemplo a otimização de parâmetros como fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações ideais como macronutrientes.

3.7 Fontes de carbono e nitrogênio

Pesquisas recentes corroboram que o crescimento microbiano e a formação de produtos são respostas altamente interativas às condições ambientais, sendo fundamental compreender o controle metabólico em função do ambiente. Estudos que monitoram em tempo real variáveis como pH e temperatura durante fermentações em estado sólido mostram que ajustar essas condições melhora significativamente o rendimento enzimático (Kabir; Ovi; Ju, 2025). Outros trabalhos com meios quimicamente definidos revelam quais nutrientes são limitantes e demonstram que a formulação do meio (fontes de carbono e nitrogênio, vitaminas, oligoelementos) pode ser otimizada para favorecer o crescimento ótimo e reduzir custos (Goldmanns *et al.* 2023). Revisões contemporâneas enfatizam ainda que regulação metabólica, incluindo resposta a estressores físicos, químicos, disponibilidade de substrato, e inibições ambientais, é chave para projetar processos fermentativos eficientes (Moreno; Rojo, 2022).

A formulação do meio e o controle das condições ambientais, como pH, temperatura e disponibilidade de carbono e nitrogênio, são determinantes para otimizar processos fúngicos, pois influenciam o equilíbrio entre crescimento e produção de metabólitos ou enzimas. Ajustes na razão C/N, no tipo de fonte nitrogenada e no uso de tampões de pH têm sido aplicados para modular o rendimento de biomassa em relação à síntese de metabólitos, além de reduzir custos operacionais. Relações C/N baixas, em torno de 10:1, tendem a

favorecer a síntese proteica, enquanto valores elevados estimulam a produção de metabólitos secundários, embora os pontos ótimos sejam espécie-dependentes. A utilização de fontes preferenciais, como glicose ou amônio, pode ainda desencadear mecanismos de repressão catabólica, afetando a expressão de enzimas secretoras e vias catabólicas. Dessa forma, a formulação do meio deve conciliar as exigências biológicas do microrganismo com as limitações técnicas e econômicas do processo industrial (Chen *et al.* 2022b; Kerkaert; Huberman, 2023; Han *et al.* 2024; Lübeck; Lübeck, 2022; Hoyos *et al.* 2024).

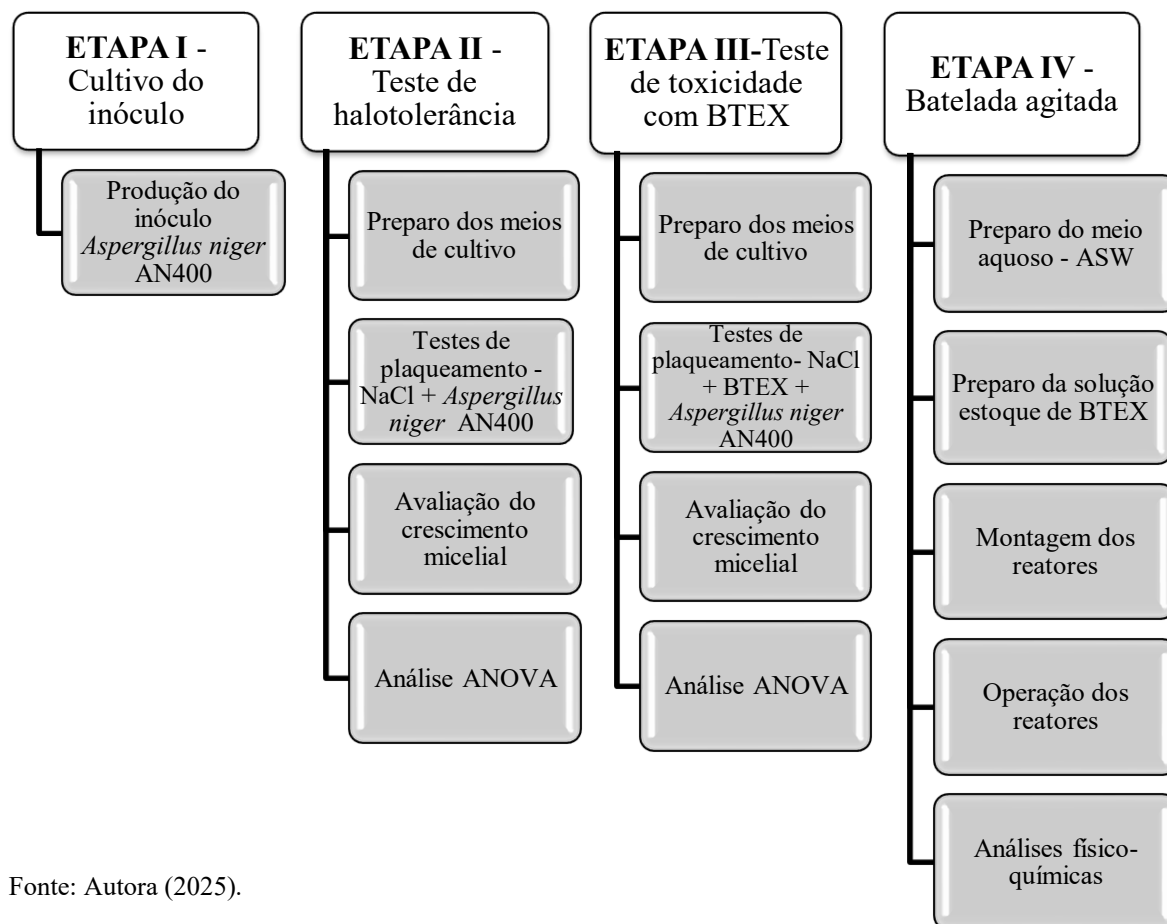
Estudos recentes sobre fermentação submersa demonstraram que a produção de enzimas e metabólitos por *Aspergillus niger* foi fortemente influenciada pela escolha das fontes de carbono e nitrogênio, além de parâmetros como pH, inóculo e agitação. Por exemplo, em *A. niger* LFP-1, a atividade de pectinase aumentou de ~0,9 para ~7,4 U/mL ao se utilizar 2,5% (p/v) de pectina e 0,4% de nitrato de amônio sob 150 rpm (Mat Jalil *et al.* 2023).

De forma semelhante, a otimização com sacarose, extrato de levedura e cloreto de amônio elevou de 4 a 5 vezes a produção de fructosiltransferase em relação ao meio inicial (Wu *et al.* 2025). Já em cultivos visando produção de quitosana, o uso de “farelo de trigo + extrato de levedura” resultou em maiores rendimentos de biomassa e produto, evidenciando o potencial de fontes orgânicas de nitrogênio e substratos alternativos de menor custo (Marchezi *et al.* 2025). Em conjunto, esses resultados endossam que a seleção adequada de nutrientes, associada ao ajuste de condições operacionais, é decisiva para maximizar a eficiência de processos biotecnológicos com *A. niger*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da pesquisa estão apresentadas na Figura 2 e foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal do Ceará (IFCE).

Figura 2 — Fluxograma das etapas realizadas na pesquisa.

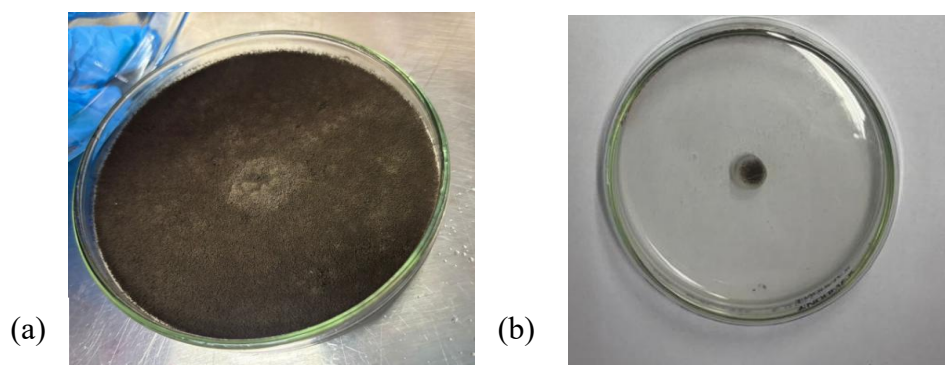


Fonte: Autora (2025).

4.1 Cultivo do fungo *Aspergillus niger* AN400

O fungo *Aspergillus niger* AN400, cuja linhagem pertence à micoteca do Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal do Ceará (IFCE), foi repicado em placas de Petri estéreis contendo 15 mL do meio de cultivo Agar *Sabouraud* Dextrose. A inoculação foi feita a partir de discos de micélios de 8 mm contendo 2×10^6 esporos de fungo (Figura 3b) de placas do estoque da micoteca (Figura 3a) e posteriormente incubadas na estufa microbiológica (marca Quimis – modelo 831612) a 30°C por 7 dias ou até a esporulação máxima. Este procedimento tem como finalidade a produção de discos miceliais mais novos para serem utilizados na etapa do teste de halotolerância.

Figura 3 — Placa com a cepa do fungo *Aspergillus niger* AN400 crescidos em meio de cultura Ágar *Sabouraud* Clorafenicol (a); Inóculo dos discos de micélios em meio de cultura (b).



Fonte: Autora (2025)

4.2 Preparo dos meios de cultivo para o teste de halotolerância

Para avaliar os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e na esporulação de *Aspergillus niger* em concentrações de salinidade definidas (5‰¹, 10‰, 20‰ e 30‰) foram testadas diferentes composições de meios de cultivo. Como fonte de nitrogênio foram utilizados cloreto de amônio e extrato de levedura, no meio Água do mar sintética (ASW), e triptona, peptona e nitrato de sódio, respectivamente presentes nos meios Ágar *Sabouraud* Dextrose e Czapek. As formulações avaliadas incluíram meios preparados com diferentes concentrações de glicose (0,5 e 5 g/L para os meios ASW, 40 g/L para Ágar *Sabouraud*) e para o meio Czapek, sacarose (30 g/L). A composição completa dos meios de cultivo utilizados no teste de halotolerância está detalhada nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 — Composição da Água do Mar Sintética (ASW) (g/L).

Componentes	Concentração (g/L)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	9,68
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,36
KCl	0,61
Na ₂ HPO ₄	0,000014
NaHCO ₃	0,17
KBr	0,1
Na ₂ SO ₄	3,47
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,040
H ₃ BO ₃	0,030
Ágar	15
Antibiótico Megacilin Super Plus®	0,1
NaCl	5, 10, 20 e 30
Solução de Vishiniac	1 mL.

Fonte: adaptado de Kossuga *et al.* (2012) e Alvarenga *et al.* (2014).

¹ ‰ (ppm, partes por mil).

Quadro 2 — Componentes dos meios padrão Czapec e Agar *Sabouraud* Dextrose salinos.

Meios	Composição
Czapec	ágar bacteriológico (12 g/L), cloreto de potássio (0,5 g/L), sacarose (30 g/L), glicerofosfato de magnésio (0,5 g/L), sulfato ferroso (0,01 g/L), sulfato de potássio (0,35 g/L), nitrato de sódio (2 g/L), antibiótico estreptomicina (0,03 g/L), Solução Vishniac (1 mL), NaCl (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L).
Agar <i>Sabouraud</i> Dextrose	ágar (15 g/L), triptona (5 g/L), peptona (5 g/L), glicose (40 g/L), cloranfenicol (0,05 g/L), NaCl (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L e 30 g/L).

Fonte: Autora (2025).

Os meios de cultivo à base de água do mar artificial (ASW) foram suplementados com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Os meios denominados ELG continham extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, enquanto os meios CAG continham cloreto de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono. Os valores 0,5 e 5,0 g/L de glicose adicionada simulam condições de baixo e alto aporte de carbono, respectivamente. Os meios de cultivo Czapec e Ágar *Sabouraud* Dextrose foram produzidos de acordo com o fabricante.

No Quadro 3 são descritos os 6 meios de cultivo produzidos, explicitando fonte de carbono e nitrogênio e suas concentrações. Em todos os meios foram adicionados NaCl em diferentes concentrações (5‰, 10‰, 20‰ e 30‰).

Quadro 3 — Quadro geral dos meios de cultivo e fontes nutricionais.

Meio de Cultivo	Fonte de Carbono (g/L)	Fonte de Nitrogênio (g/L)	Fonte
ASW ELG 0,5	Glicose (0,5)	Extrato de levedura (0,02)	Adaptado de Birolli <i>et al.</i> (2018)
ASW ELG 5	Glicose (5)	Extrato de levedura (0,02)	Adaptado de Birolli <i>et al.</i> (2018)
ASW CAG 0,5	Glicose (0,5)	Cloreto de amônio (0,02)	Adaptado de Gulati <i>et al.</i> (1999)
ASW CAG 5	Glicose (5)	Cloreto de amônio (0,02)	Adaptado de Gulati <i>et al.</i> (1999)
Czapec salino	Sacarose (30)	Nitrato de sódio (2)	De acordo com o fabricante KASVI
<i>Sabouraud</i> salino	Glicose (40)	Peptona (5), triptona (5)	De acordo com o fabricante KASVI

Fonte: Autora (2025).

4.3 Teste de Halotolerância

Além das placas nas quais o *Aspergillus niger* foi submetido ao efeito da salinidade, também foram preparadas placas controle contendo apenas o meio de cultivo, sem NaCl.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave vertical CS (Prismatec) a 121°C por 15 min e 15 mL foram colocados em cada placa Petri com auxílio de uma pipeta volumétrica. As manipulações foram realizadas em uma capela de fluxo laminar (Filterflux) previamente desinfetada com solução aquosa de etanol a 70% e luz UV por 20 min.

Os discos miceliais utilizados nesta etapa foram obtidos com um perfurador de aço de 8 mm de diâmetro contendo 2×10^6 esporos de fungo cada a partir das cepas inoculadas na etapa de cultivo. Após a solidificação do meio específico do teste, os discos foram transferidos com o auxílio de uma alça de platina e posicionados no centro das placas de Petri. As placas foram mantidas em uma estufa microbiológica a 30°C por 7 dias, período necessário para a ocupação total da colônia fúngica na área superficial da placa.

O ensaio foi conduzido em triplicata para cada salinidade e para as placas controle. A medição do espaço ocupado pela colônia fúngica foi realizada dividindo a área total em quadrados de 1cm² cada, permitindo a obtenção de uma área total milimetrada para a contagem dos quadrados ocupados pelo crescimento da colônia. Em algumas placas, o crescimento fúngico ocorreu de forma dispersa, com desenvolvimento da colônia a partir de mais de um centro radial. Além disso, foi acompanhado o crescimento por meio de registro fotográfico.

4.4 Preparo dos meios de cultivo para o teste de toxicidade a BTEX

Após verificada a capacidade de crescimento dos fungos quanto a concentração de sal, fonte de carbono e nitrogênio, conforme os dados do teste de halotolerância, os meios de cultivo selecionados para o teste de toxicidade foram ASW CAG 0,5 e ASW ELG 0,5, ambos com salinidade de 30‰. Os componentes desses meios estão descritos nos Quadros 1 e 3.

Para o teste de toxicidade, além dos meios de cultivo, foi adicionado BTEX nas concentrações de 1200 µg/L e 4000 µg/L, tendo como objetivo avaliar a capacidade do *Aspergillus niger* crescer sob o efeito adverso da maior salinidade tolerada no teste de halotolerância, porém na presença de BTEX. No Quadro 4 está apresentado a descrição do preparo da solução estoque concentrada a 2000 mg/L e as respectivas concentrações de BTEX no ensaio de plaqueamento.

Quadro 4 — Preparo da solução estoque de BTEX e suas concentrações nas placas de Petri.

Concentração	Composição	Volume adicionado	Equivalência na placa (µg/L)
--------------	------------	-------------------	------------------------------

Solução Estoque a concentração de 2000 mg/L de BTEX	100 µg/L de Benzeno (Cromoline P.A), 100 µg/L de Toluol (Synth P.A), 100 µg/L de Ethylbenzene (Sigma-Aldrich 99,8%), 100 µg/L de Xilenos (Dinâmica P.A) diluídos em 200 mL de etanol.	-	-
Concentração de 1200 µg/L	Solução Estoque de BTEX	11 µL da solução estoque.	300 µg/L de benzeno, 300 µg/L de tolueno, 300 µg/L de etilbenzeno, 300 µg/L de xilenos.
Concentração de 4000 µg/L	Solução Estoque de BTEX	35 µL da solução estoque.	1000 µg/L de benzeno, 1000 µg/L de tolueno, 1000 µg/L de etilbenzeno, 1000 µg/L de xilenos.

Fonte: Autora (2025).

A escolha das concentrações de BTEX baseou-se na média de valores da caracterização da água produzida em plataformas de óleo e gás de acordo com Gabardo (2007).

4.5 Teste de toxicidade a BTEX

Foi verificada a velocidade de crescimento micelial sob condições de salinidade e exposição ao poluente BTEX, aplicando-se plaqueamento em triplicata, realizado à temperatura de 30°C, durante 7 dias. Todos as vidrarias e todos os meios foram esterilizados em autoclave vertical CS (Prismatec) a 121°C por 15 minutos. Para o teste de toxicidade, a composição dos meios de cultivo encontra-se descrita no Quadro 5.

Quadro 5 — Descrição da composição dos meios de cultivo em cada grupo do teste de toxicidade.

	Experimento	Composição
ASW CAG 0,5 Fonte de nitrogênio: Cloreto de Amônio	Branco	Meio ASW + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	Controle	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	1200 BTEX	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + 300 µg/L de cada composto BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	4000 BTEX	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + 1000 µg/L de cada composto BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
ASW ELG 0,5	Branco	Meio ASW + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	Controle	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + discos miceliais de <i>Aspergillus</i>

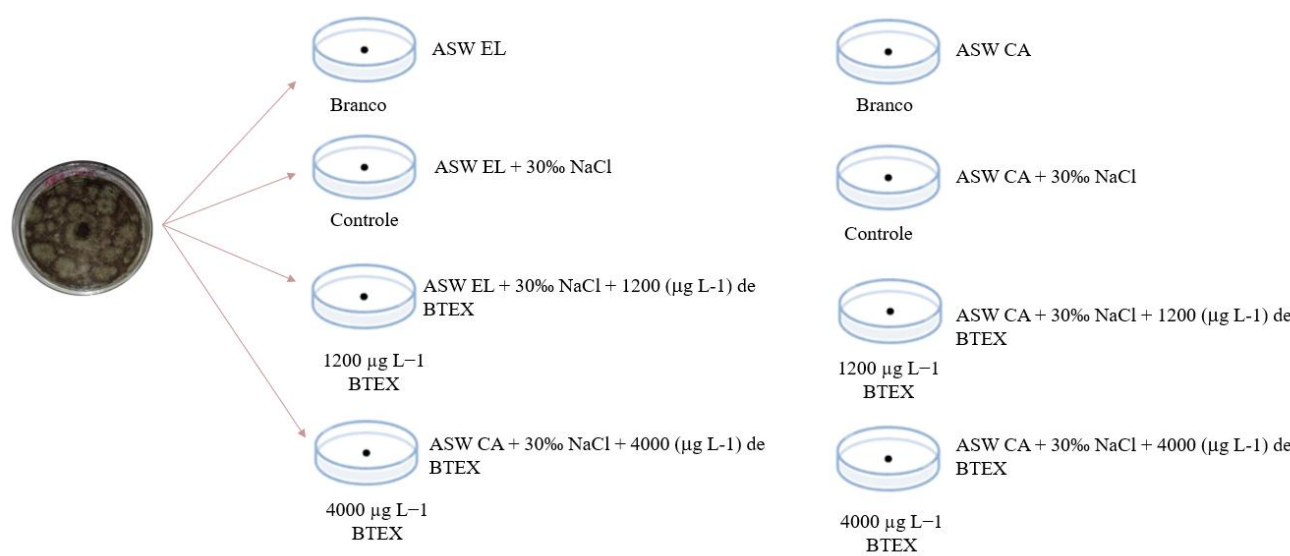
Fonte de nitrogênio: Extrato de Levedura		<i>niger</i> AN400.
	1200 BTEX	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + 300 µg/L de cada composto BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	4000 BTEX	Meio ASW + 30 g/L de NaCl + 1000 µg/L de cada composto BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.

Fonte: Autora (2025)

Após a esterilização dos meios, 15 mL foram colocados em cada placa de Petri com auxílio de uma pipeta volumétrica. Antes da solidificação do meio, em temperatura ambiente a 27°C, a solução estoque de BTEX foi adicionada diretamente nas placas de Petri, de acordo com a concentração pretendida, com o auxílio de uma micropipeta, sendo homogeneizadas com movimentos em “8” de acordo com o trabalho de Rodrigues *et al.* (2025). Discos miceliais de 8 mm contendo 2×10^6 esporos de fungo cada do fungo *Aspergillus niger* AN400 já crescendo em placas com salinidade de 30‰ (m/v), em meio ASW ELG 0,5 e ASW CAG 0,5, oriundos do teste de halotolerância, foram inoculados em placas de Petri com 9 cm de diâmetro.

Na Figura 4 é apresentado um fluxograma sobre o teste de plaqueamento realizado no qual o crescimento de *Aspergillus niger* AN400 sob o efeito adverso da salinidade e exposição aos BTEX – placas com 1000 µg/L e com 300 µg/L de cada composto – foi monitorado.

Figura 4 — Representação do teste de toxicidade para monitoramento do crescimento do fungo sob o efeito adverso da salinidade e na presença de BTEX.



Fonte: Autora (2025)

As manipulações foram realizadas em uma capela de fluxo laminar (Filterflux) previamente desinfetada com solução aquosa de etanol a 70% e luz UV por 20 min. As placas foram mantidas em uma estufa microbiológica a 30°C por 7 dias, período necessário para a ocupação da colônia fúngica na área superficial da placa, com medições diárias do crescimento micelial e acompanhado o crescimento por meio de registro fotográfico.

4.5.1 Avaliação do crescimento micelial nas placas

A avaliação do crescimento foi feita por meio do diâmetro teórico, com base na área superficial ocupada pela colônia durante o crescimento nas placas ao longo de 7 dias de cultivo. O cálculo para estimar os valores de diâmetro teórico (Equação 1) foi determinado conforme Mello (2018)

$$D = \sqrt{\left(\frac{4 \cdot A}{\pi}\right)} \quad (01)$$

Onde:

D : Diâmetro Teórico (cm)

A : Área ocupada pelo fungo (cm²)

A partir da obtenção do diâmetro teórico, estimou-se a velocidade de crescimento das colônias ou de crescimento micelial (VCM) seguindo a Equação 2, conforme Oliveira (1991)

$$VCM = \sum \left(\frac{(D - Da)}{N} \right) \quad (02)$$

Onde:

VCM : velocidade de crescimento micelial (cm/dia)

D : diâmetro da colônia em um tempo t_n , com $n \neq 0$.

Da : diâmetro médio da colônia em um tempo $t_n - 1$

N : número de dias após a inoculação (t_0)

4.6 Análise estatística

Os dados sobre a velocidade de crescimento dos fungos em placas foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e ao teste de Levene para homocedasticidade ($p < 0,05$) usando o programa R 3.3.0. As variáveis que atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância foram analisadas por meio de ANOVA unifatorial e bifatorial, seguidas pelo Teste de Tukey, para comparar diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A análise ANOVA unifatorial foi realizada para comparação de diferenças de significância estatística ($p < 0,05$) entre as concentrações de NaCl em um mesmo meio de cultivo, no teste de halotolerância e as concentrações de BTEX no teste de toxicidade.

A análise ANOVA bifatorial foi utilizada para comparar as diferenças de significância estatística ($p < 0,05$) entre o mesmo meio de cultivo e as duas concentrações de glicose (0,5 e 5,0 g/L) para o teste de halotolerância e entre os meios de cultivo (EL e CA) no teste de toxicidade. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos, enquanto valores de p maiores que 0,05 foram considerados não significativos.

4.7 Ensaio com reatores em batelada e biomassa dispersa para remoção de BTEX

4.7.1 Preparo das cepas fúngicas

O meio de cultura utilizado para crescimento dos fungos para essa etapa foi a água do mar sintética (ASW), cuja composição está descrita no Quadro 1 com definição de salinidade 30‰ de NaCl e cloreto de amônio 0,02 g/L como fonte de nitrogênio. Após preparada, a solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Em uma capela de fluxo laminar previamente esterilizada os meios de cultura, 15 ml foram colocados em placas de Petri para repicagem de fungo *Aspergillus niger* AN 400 a serem utilizados nos reatores das etapas seguintes. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a cerca de 30 °C por um período de sete dias para usos posteriores nos ensaios das bateladas.

4.7.2 Constituição do meio sintético ASW

O meio sintético adaptado de *Kossuga et al.* (2012) e *Alvarenga et al.* (2014) possuía em sua composição (g/L): 9,68 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,36 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,61 KCl; 0,000014 Na_2HPO_4 ; 0,17 NaHCO_3 ; 0,1 KBr; 3,47 Na_2SO_4 ; 0,040 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,030 H_3BO_3 ; 0,1 Antibiótico Megacilin Super Plus®; 30 NaCl; 0,02 NH_4Cl ; Após preparação de água sintética adicionada de solução de Vishniac na proporção 1 mL/L, a solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

4.7.3 Montagem dos reatores em batelada com biomassa dispersa

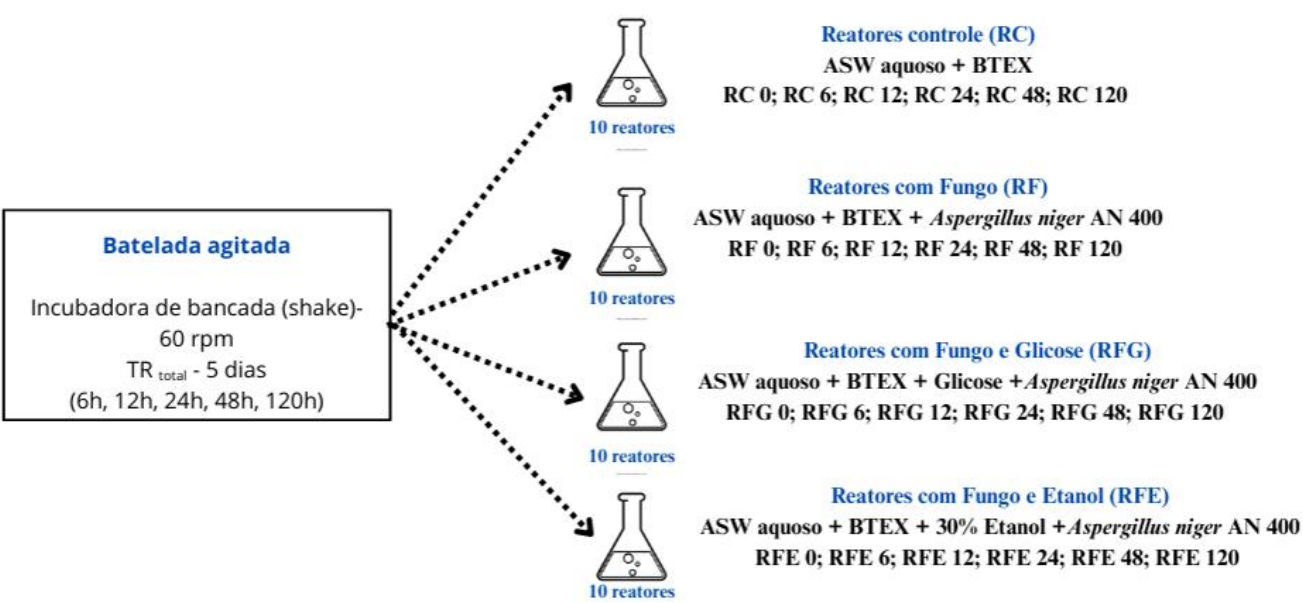
Foi preparada a solução aquosa de ASW com adição de NaCl na maior concentração em que houve crescimento dos fungos no teste de halotolerância (30‰) bem como foi preparada uma solução estoque de BTEX (153 g/L para cada composto) para posterior

adição nos reatores, após esterilização do meio e retorno à temperatura ambiente (~25°C). Os experimentos foram realizados em duplicata por desmonte em temperatura ambiente em uma incubadora de bancada, conhecida como shake, modelo CT-712 da Cientec (Figura 6).

Em relação ao uso dos BTEX optou-se pelo uso da concentração total de 6000 mg/L (1500 mg/L de cada composto), seguindo a metodologia de Rodrigues *et al.* (2025). Após a adição do BTEX, o pH foi ajustado para 5 para melhor crescimento fúngico.

Os reatores foram operados por desmonte. A cada tempo reacional a duplicata era retirada para análise sendo o dia da montagem considerada o dia zero (0 h) e Tempos de Reação (TR) posteriores de 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 120 h para quatro grupos de reatores, conforme detalhado no Quadro 6, resultando em um total de 40 reatores.

Figura 5 — Representação e descrição da batelada agitada.



Fonte: Autora (2025).

Quadro 6 – Configuração e composição dos grupos de reatores (RC, RF, RFG, RFE).

Meios aquoso	Reator	Composição
Água do mar sintética (ASW) – 30‰ de NaCl com Cloreto de amônio (0,02g/L).	RC	Meio aquoso ASW + BTEX.
	RF	Meio aquoso ASW + BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	RFG	Meio aquoso ASW + 0,5 g/L de glicose + BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.
	RFE	Meio aquoso ASW + 30% de etanol + BTEX + discos miceliais de <i>Aspergillus niger</i> AN400.

Fonte: Autora (2025).

Conforme metodologia de Bermúdez *et al.* (2019), os reatores em batelada agitada foram montados em agitadores rotatórios do shake, com velocidade de 60 rpm, e temperatura ambiente de $27 \pm 4^\circ\text{C}$. Os reatores consistiram em erlenmeyers de 250 mL (previamente esterilizados) com volume reacional de 200 mL com adição de BTEX na concentração total de 6000 mg/L. Foram inseridos também em cada reator 10 discos miceliais de 8 mm de diâmetro do fungo *Aspergillus niger* AN400, conforme descrição no tópico 4.7.1. Por fim, os reatores foram fechados com jornal e papel alumínio para evitar fotodegradação do meio conforme representados na Figura 6.

Figura 6 — Reatores em agitação na incubadora de bancada (shake).



Fonte: Autora (2025)

Alíquotas do meio de cada reator em 120 h foram retiradas e preservadas individualmente em frascos âmbar para análise de BTEX.

4.7.4 Análises realizadas

Foram realizadas determinações de pH, DQO bruta e filtrada conforme APHA (2022), além da atividade enzimática de lacase, fenóis e BTEX.

A atividade lacase foi medida utilizando 2,2-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) como substrato (Buswell *et al.* 1995). A mistura da reação foi composta por 3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 6 mL da solução enzimática e 1 mL de ABTS a 0,03% (p/v). Após leitura inicial, as amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos, e logo depois foi realizada a segunda leitura.

A oxidação do ABTS foi monitorada pela variação de absorbância a 420 nm, utilizando coeficiente de extinção molar (ϵ) de $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade enzimática foi expressa em unidades enzimáticas (U), sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima necessária para promover a oxidação de $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de substrato por minuto sob as condições de ensaio. Os resultados foram normalizados e apresentados em U/L do extrato enzimático, com os cálculos baseados na Equação 3, a qual se fundamenta na Lei de Beer-Lambert.

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad (03)$$

Onde:

ΔA : diferença entre a absorbância final e a inicial

V: volume da reação ($0,001 \text{ L}$ em todos os casos)

10^6 : converte os mols de ϵ para μmols

ϵ : coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

R: quantidade de caldo enzimático (L)

t: tempo de reação (min)

A análise de fenóis totais em meio aquoso foi realizada pelo método colorimétrico com cloreto férrico (Apostică *et al.* 2018), em que 10 mL da amostra foram reagidos com 1 mL de solução de FeCl_3 , aguardando-se 2–3 minutos antes da leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro UV-VIS (Genesys 150) no comprimento de onda de 540 nm . A curva padrão de fenóis foi realizada variando entre $0,5$ e $2,5 \text{ mg/L}$ de uma solução estoque de $0,1 \text{ mol/L}$ de fenol.

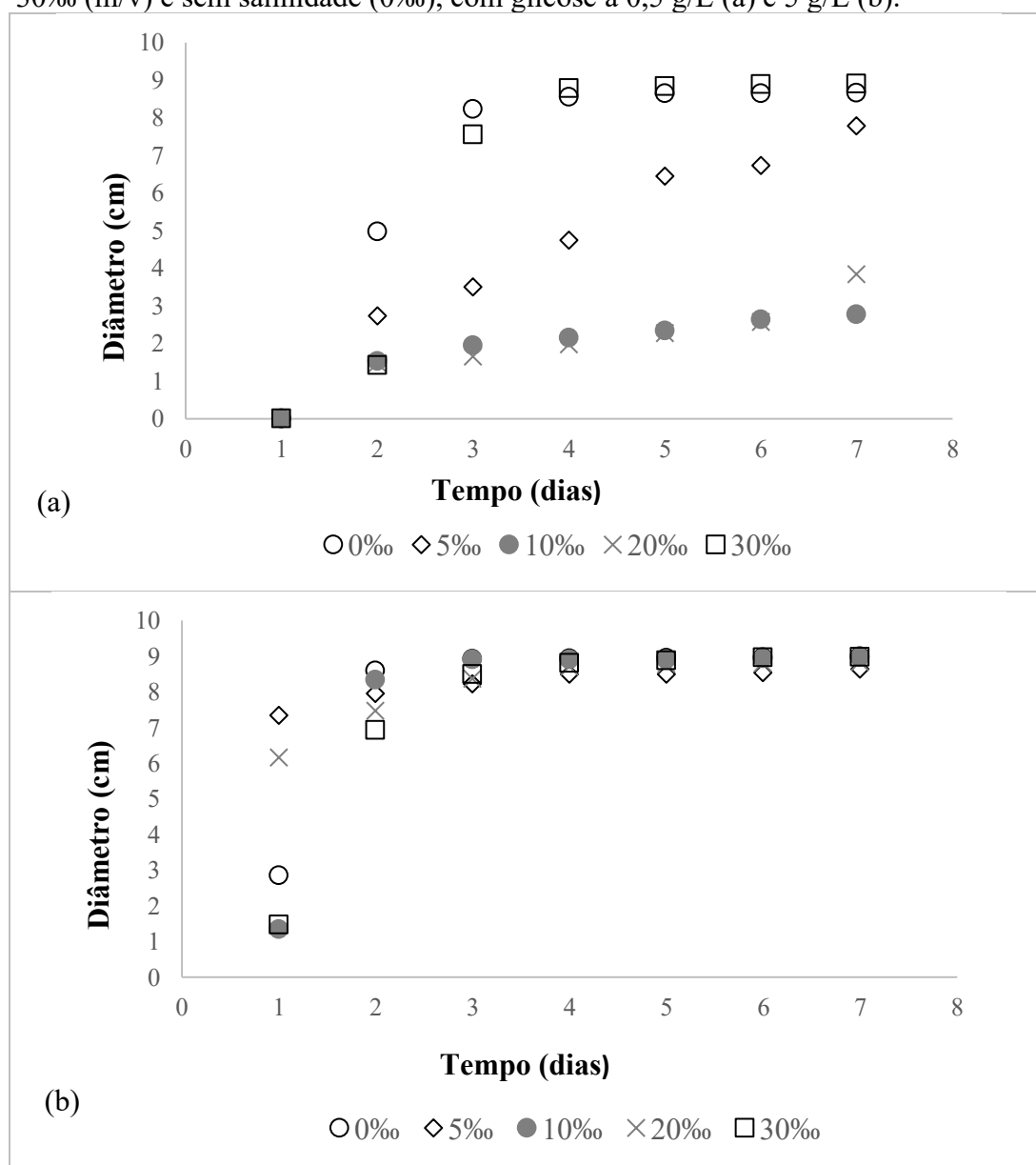
A determinação de BTEX foi feita em laboratório acreditado, utilizando cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS Agilent 7890, ION TRAP, EPC, injetores Split/Splitless) equipado com coluna capilar Zebron ZB-5MS PLUS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ } \mu\text{m}$, Phenomenex), conforme metodologia EPA 8260 e preparo por EPA 5021A (Headspace), abordagem empregada e validada na literatura recente, incluindo o estudo de Xin *et al.* (2024). As condições operacionais incluíram: seringa de $2,5 \text{ mL}$ a 90°C , agitador a 80°C , tempo de incubação de 20 min sob agitação de 500 rpm , e programa de forno com início a 35°C (1 min), seguido de rampa de 10°C/min até 210°C , mantidos por $18,5 \text{ min}$ (tempo total de corrida $\sim 25 \text{ min}$). Para concentração inicial de BTEX foi considerado o valor teórico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de Haloterância e avaliação de crescimento de *Aspergillus niger* com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Nas Figuras 7a e 7b são apresentados o crescimento das colônias de *Aspergillus niger* nas diferentes salinidades para o meio ASW acrescidos de extrato de levedura (EL) e glicose em diferentes concentrações.

Figura 7 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro nos meios de cultura ASW com extrato de levedura (EL), nas salinidades de 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem salinidade (0‰), com glicose a 0,5 g/L (a) e 5 g/L (b).



Fonte: Autora (2025)

A influência do aumento da concentração de glicose no desenvolvimento de *Aspergillus niger*, especialmente nos primeiros dias de cultivo (dias 1 e 2), pode ser explicada pelas etapas do crescimento microbiano, conforme descrito por Madigan *et al.* (2019). Segundo esses autores, na fase *lag*, os microrganismos se adaptam ao ambiente e preparam-se para o crescimento, processo que pode ser acelerado pela disponibilidade de uma fonte de carbono de fácil assimilação, como a glicose.

Nesse contexto, a maior concentração de glicose (5 g/L) provavelmente forneceu energia suficiente para que o fungo superasse rapidamente a fase *lag* e iniciasse a fase exponencial, caracterizada por intensa multiplicação celular. De acordo com Prescott *et al.* (2020), na fase estacionária a taxa de crescimento celular diminui devido à escassez de nutrientes ou ao acúmulo de metabólitos inibidores, o que pode explicar essa estabilização observada.

Assim, o crescimento acelerado observado nos dois primeiros dias pode ser atribuído à maior disponibilidade de energia na forma de glicose, que possibilitou a rápida transição para a fase exponencial. Por outro lado, a estabilização nos dias seguintes sugere o início da fase estacionária, possivelmente influenciada por fatores como a salinidade e a limitação física pelo efeito da restrição de borda, relacionada ao diâmetro da placa de Petri, que influenciou a estabilização do crescimento. Caso o diâmetro fosse maior, essa estabilização poderia ocorrer mais tardiamente, possivelmente após o segundo ou terceiro dia, hipótese que ainda necessita de confirmação experimental.

Comparando os grupos de placas de Petri com mesma fonte de nitrogênio, extrato de levedura e variando a concentração de glicose (Figura 7a e 7b), o crescimento do fungo foi impactado pelos valores de salinidade (5‰, 10‰ e 20‰), particularmente na concentração de glicose 0,5 g/L. Na Tabela 3 são apresentados os valores de velocidade média para cada um dos grupos de placas de Petri segundo a salinidade exposta aos fungos no meio ASW EL.

Em condições de 0‰ de salinidade, observou-se o crescimento com um diâmetro médio final de 8,66 cm e uma velocidade média de $2,74 \pm 0,23$ cm/dia sendo que para salinidade de 30‰, a velocidade média resultante ($2,96 \pm 0,03$ cm/dia) e o diâmetro final foram ligeiramente maiores (8,90 cm). Isso sugere que, em condições de alta salinidade (30‰), o fungo pode ter ativado mecanismos adaptativos que o permitiram um desempenho semelhante ao observado em condições sem sal. Oren (2024) relata em seus estudos que microrganismos halofílicos contam com adaptações particulares que os capacitam a prosperar em ambientes altamente salinos.

Tabela 3 — Velocidades de crescimento do *Aspergillus niger* no meio ASW EL variando salinidade e concentração de glicose.

Salinidade (‰ NaCl, m/v)	Velocidade (cm/dia)	
	<i>glicose 0,5 g/L</i>	<i>glicose 5 g/L</i>
0	2,74 ± 0,23	2,49 ± 0,06
5	2,59 ± 0,29	0,29 ± 0,18
10	0,97 ± 0,10	2,51 ± 0,03
20	1,44 ± 0,85	0,99 ± 0,10
30	2,96 ± 0,03	2,33 ± 0,15

Fonte: Autora (2025).

Um desses mecanismos pode estar relacionado à produção de enzimas halotolerantes e termotáveis, como demonstrado por Cai *et al.* (2024), que estudaram uma endoglucanase de *A. niger* marinho e observaram que a presença de íons Na⁺ e Cl⁻ pode influenciar a atividade e estabilidade dessas enzimas. Esse efeito ocorre porque os íons formam interações com resíduos carregados das proteínas, estabilizando o sítio de ligação ao substrato e contribuindo para a resistência a condições extremas.

Nas concentrações de sal de 10‰ e 20‰ os diâmetros finais (2,77 cm e 3,84 cm, respectivamente) tiveram uma redução maior, se comparadas às outras condições do teste, bem como as menores velocidades médias (0,97 ± 0,10 cm/dia e 1,44 ± 0,85 cm/dia). De acordo com o teste ANOVA há diferença estatística (p=0,0000367). O teste de Tukey confirma que o fungo cresce melhor e de forma semelhante nas das concentrações de 5‰ e 30‰ e de forma similar nas concentrações de 10‰ e 20‰ nas placas com 0,5 g/L de glicose. Calabrese (2004) propôs a existência de respostas horméticas em microrganismos, em que concentrações baixas a moderadas de agentes estressores, como o sal, tendem a inibir o crescimento, enquanto concentrações mais altas podem ativar mecanismos de defesa celular.

Com o aumento da concentração de glicose, mesmo em concentrações salinas maiores, como 10‰, 20‰ e 30‰, o fungo alcançou diâmetros médios (8,97 cm) próximos ao observado em 0‰ de salinidade (8,99 cm) em torno do 3º dia. Este comportamento pode ser explicado provavelmente pelo maior aporte energético fornecido pela glicose, que potencialmente contribuiu para a manutenção das funções celulares, mesmo em condições adversas. Jansen *et al.* (2018) identificaram que *A. niger* ajusta seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de fontes de carbono no ambiente, consumindo açúcares de maneira sequencial por meio de um controle refinado de seus mecanismos de regulação metabólica.

Essa capacidade permite ao fungo otimizar o uso de recursos energéticos, tornando-o mais resiliente em ambientes de alta salinidade, onde a disponibilidade de nutrientes pode ser limitada.

É possível observar que as velocidades de crescimento do fungo são impactadas pelas concentrações de salinidades moderadas (5‰ e 20‰), com valores de $0,29 \pm 0,18$ cm/dia e $0,99 \pm 0,10$ cm/dia, respectivamente. Zhuang *et al.* (2010), em seus estudos relataram que níveis moderados de sal podem causar um estresse osmótico considerável que inibe o crescimento de microrganismos. Em contrapartida e em situações de maior salinidade podem desenvolver adaptações que lhes permitem não apenas sobreviver, mas também prosperar, no entanto, a transição para essas condições pode não ser tão eficiente em níveis intermediários de salinidade onde o equilíbrio osmótico se mostra mais desafiador.

Os padrões de crescimento observados nos experimentos de halotolerância são coerentes com mecanismos fisiológicos bem descritos em fungos halotolerantes. A resposta ao estresse salino envolve o acúmulo de solutos compatíveis (glicerol e outros polióis) para manutenção do potencial osmótico intracelular, remodelagem da parede celular (alterações em glucanos e quitina) para redução do estresse mecânico, ativação de sistemas de transporte iônico (antiportes Na^+/H^+ e canais/transportadores de K^+) e indução de respostas antioxidantes que mitigam espécies reativas formadas durante a exposição salina. Essas respostas combinadas explicam a redução inicial nas taxas de crescimento seguida de aclimação e retomada parcial do crescimento em salinidade moderada, além de alterações morfológicas típicas observadas em placas e em cultura submersa. Em *Aspergillus niger*, vias de sinalização relacionadas à parede celular e regulação osmótica atuam em conjunto, permitindo que cepas halotolerantes mantenham metabolismo ativo em meios com atividade de água reduzida, o que justifica o desempenho consistente do isolado AN400 nas condições ASW utilizadas (Pérez-Llano *et al.* 2020; Nivedita *et al.* 2021; Jiménez-Gómez *et al.* 2022).

Verificou-se que os valores de velocidade média nas placas onde os fungos cresceram no meio ASW EL 5 com salinidade 30‰ ($2,33 \pm 0,15$ cm/dia) não ficaram muito distantes ao registrado nas placas em que o crescimento ocorreu na ausência de salinidade ($2,74 \pm 0,23$ cm/dia), com concentração de glicose 0,5 g/L.

Esses resultados indicam que *Aspergillus niger* AN400 apresenta uma perceptível capacidade de adaptação a ambientes salinos. A análise estatística (ANOVA unifatorial) evidenciou que para as placas com 5 g/L de glicose, houve diferença estatística entre as concentrações de NaCl estudadas ($p = 2,70 \times 10^{-10}$). O fungo cresce de forma semelhante nas concentrações de 10‰ e 30‰ e diferem das concentrações de 5‰ e 20‰ ($p=0,007$). O

teste ANOVA e Tukey também confirma que não houve diferença estatística entre as concentrações de glicose utilizadas no meio EL ($p=0,401$; $F=17,3$).

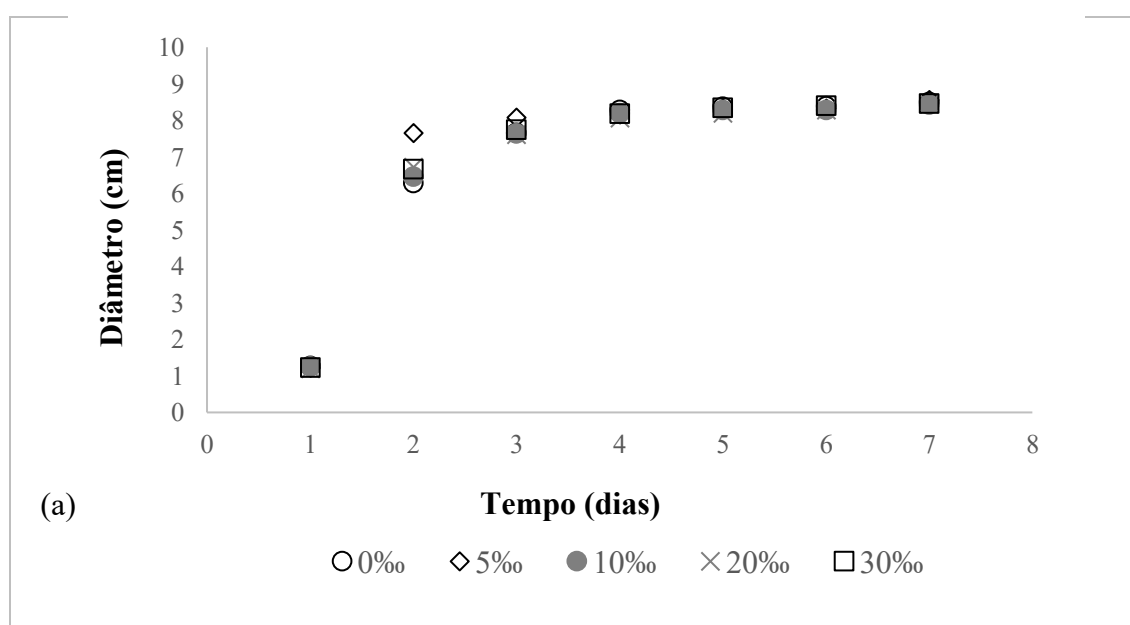
Ao se considerar o cenário de *Aspergillus niger* tendo como fonte de nitrogênio o cloreto de amônio no meio ASW com variação da concentração de glicose observou-se similaridades nas velocidades de crescimento.

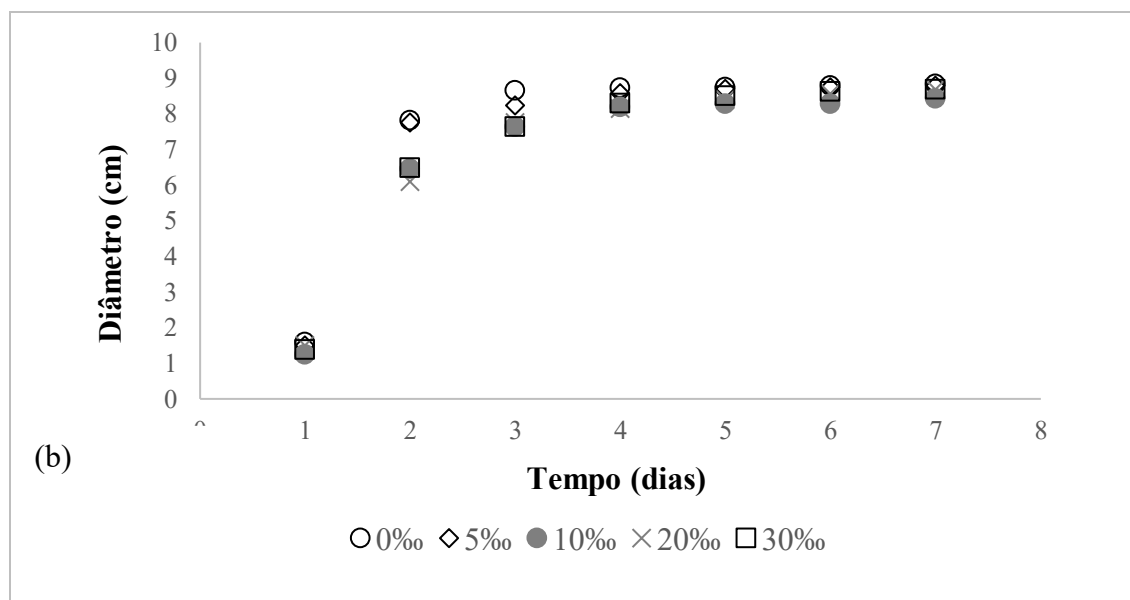
Na Figura 8 e na Tabela 4 são mostradas, respectivamente, o aumento do diâmetro colonial ao longo do tempo nos cultivos de *Aspergillus niger* na ausência e presença de salinidade em meio ASW com cloreto de amônio e glicose com 0,5 (a) e 5 (b) g/L e a velocidade de crescimento micelial.

A. niger demonstrou um crescimento uniforme em diferentes salinidades, com diâmetros finais próximos em todas as concentrações salinas analisadas (variando entre 8,43 cm e 8,80 cm) em torno do 3º dia.

A velocidade de crescimento das colônias nas placas em estudo apresentou valores próximos entre si, independente da concentração de glicose, nas diferentes concentrações de salinidades estudadas, cujos valores na ausência de salinidade foram: $2,37 \pm 0,08$ cm/dia (0,5 g/L de glicose) e $2,39 \pm 0,09$ cm/dia (5 g/L de glicose), sendo que para 30‰, maior salinidade a que os fungos foram expostos, as velocidades médias foram de $2,17 \pm 0,26$ cm/dia (0,5 g/L de glicose) e $2,41 \pm 0,10$ cm/dia (5 g/L de glicose).

Figura 8 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro nos meios de cultura ASW com cloreto de amônio (CA), nas salinidades de 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem salinidade (0‰), com glicose a 0,5 g/L (a) e 5 g/L (b).





Fonte: Autora (2025)

Tabela 4 — Velocidades de crescimento do *Aspergillus niger* no meio ASW CA variando salinidade e concentração de glicose.

Salinidade (‰ NaCl, m/v)	Velocidade (cm/dia)	
	glicose 0,5 g/L	glicose 5 g/L
0	2,37 ± 0,08	2,39 ± 0,09
5	2,42 ± 0,10	2,24 ± 0,20
10	2,12 ± 0,14	2,21 ± 0,28
20	2,19 ± 0,14	2,34 ± 0,13
30	2,17 ± 0,26	2,41 ± 0,10

Fonte: Autora (2025)

A análise estatística ANOVA confirmou a ausência de diferenças significativas na velocidade de crescimento do fungo em função das concentrações de NaCl e glicose ($p=0,19$), resultados também confirmados pelo Teste de Tukey ($F=1,62$). Portanto, mesmo em condições de baixa disponibilidade de carbono (0,5 g/L), o fungo foi capaz de manter seu crescimento em altas concentrações de salinidade, como 20‰ e 30‰. Isso sugere uma relativa tolerância do *A. niger* AN400 às condições de estresse osmótico neste cenário. Ufot *et al.* (2022) em seu trabalho justifica que os fungos em ambientes salinos podem utilizar a acumulação de solutos compatíveis e a produção de enzimas como mecanismos para equilibrar sua fisiologia em condições adversas.

Algo a se observar é que, em todas as amostras cultivadas em meios ASW, embora tenha ocorrido crescimento micelial (cm²), as colônias de *Aspergillus niger* AN400 não apresentaram esporulação máxima ao final do ciclo de 7 dias. Nas primeiras 24 horas,

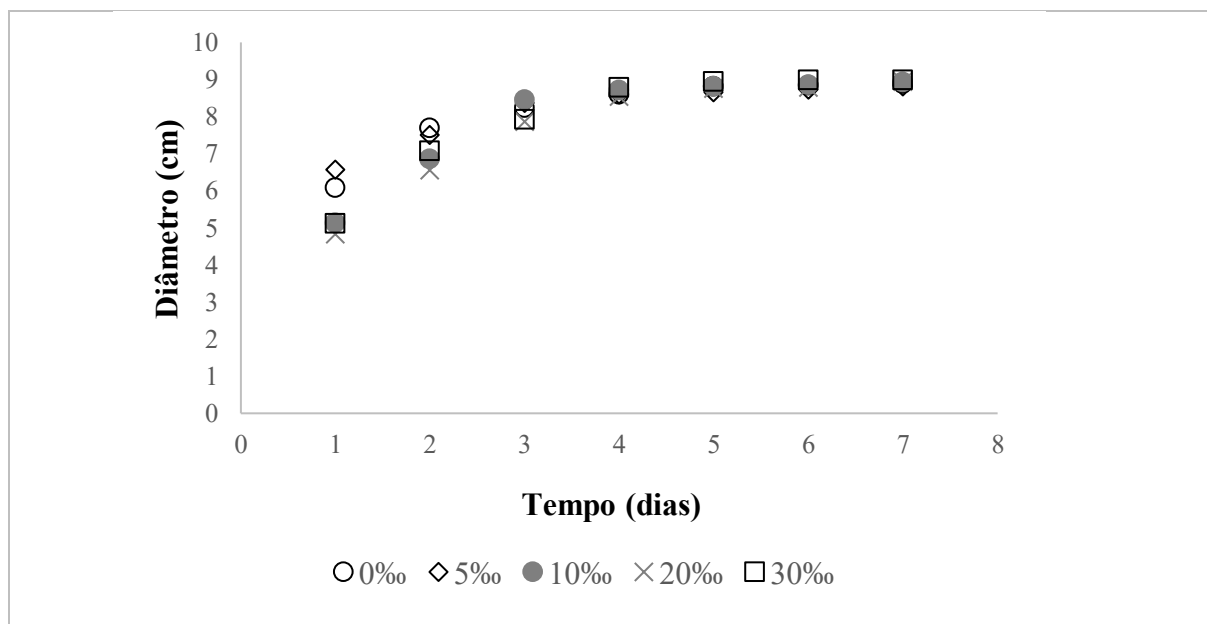
observou-se coloração esbranquiçada nas colônias, sugerindo baixa produção de esporos, o que pode estar relacionado à concentração de sais, especialmente NaCl, nos meios salinos. Essa condição promoveu a formação de conidióforos curtos e esparsos, com pouca ou nenhuma esporulação, conforme registrado nas imagens fotográficas (ver Apêndice).

Esse padrão de baixa esporulação sob estresse salino já foi descrito para diversas espécies de *Aspergillus*, em que o aumento da concentração de NaCl ou outros sais reduz a formação de conidióforos e esporos, ao mesmo tempo em que favorece o crescimento vegetativo. Tal efeito pode ser explicado pela necessidade de redirecionamento metabólico, em condições osmoticamente adversas, a célula prioriza mecanismos de sobrevivência, como o acúmulo de solutos compatíveis e o reforço da parede celular, em detrimento de processos energéticos secundários, como a reprodução assexuada. Estudos mostram que, em meios com elevada salinidade, há supressão da expressão de genes reguladores da esporulação (como *brlA* e *abaA*), associados a um aumento de genes ligados à resposta osmótica e manutenção celular (Pitt & Hocking, 2009; Zajc *et al.* 2011).

Mais recentemente, Gunde-Cimerman, Plemenitaš e Oren (2018) relataram que fungos halotolerantes exibem plasticidade fenotípica que inclui redução de esporulação como estratégia adaptativa para ambientes salinos. Dessa forma, a baixa esporulação observada em *A. niger* AN400 pode ser interpretada como um mecanismo adaptativo, garantindo a manutenção do metabolismo ativo e da capacidade degradativa, mesmo que à custa da reprodução.

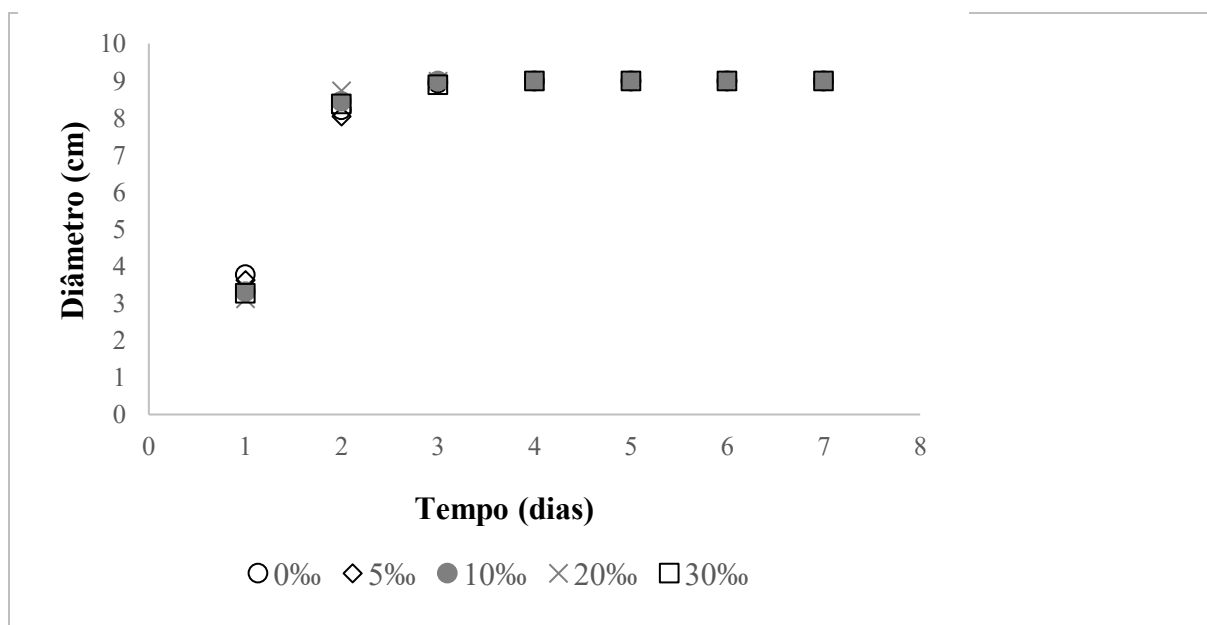
Para efeito de comparação, analisou-se o crescimento de *Aspergillus niger* AN400 nos meios padrões Czapek e *Sabouraud*. As Figuras 9 e 10 apresentam a variação do diâmetro das colônias ao longo do tempo nesses meios, com e sem salinidade, enquanto a Tabela 5 reúne as velocidades médias de crescimento obtidas.

Figura 9 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro no meio de cultura Czapek com adição de NaCl a 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem adição de NaCl (0‰).



Fonte: Autora (2025)

Figura 10 — Crescimento da colônia fúngica em termos do diâmetro no meio de cultura Sabouraud com adição de NaCl a 5‰, 10‰, 20‰ e 30‰ (m/v) e sem adição de NaCl (0‰).



Fonte: Autora (2025)

Tabela 5 — Velocidades de crescimento do *Aspergillus niger* nos meios Czapek e Sabouraud com variação nas concentrações de salinidade.

Salinidade (‰ NaCl, m/v)	Velocidade (cm/dia)	
	Czapek	Sabouraud
0	0,94 ± 0,10	1,72 ± 0,31

5	$0,74 \pm 0,27$	$1,78 \pm 0,11$
10	$1,11 \pm 0,32$	$1,90 \pm 0,32$
20	$0,51 \pm 0,04$	$1,95 \pm 0,29$
30	$0,47 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,07$

Fonte: Autora (2025)

Mesmo com maior disponibilidade de fonte primária de carbono nos meios Czapek e *Saboraud*, que se apresentam rico em sacarose (30 g/L) e glicose (40 g/L) respectivamente, as velocidades médias desenvolvidas pelo fungo foram menores, independente da ausência ou presença de salinidade, em comparação aos meios ASW que possui menor concentração de glicose (0,5 g/L). Isso indica que a cepa em estudo, nas condições do experimento, suporta seu crescimento tanto na condição de elevada concentração de matéria orgânica quanto em sua menor disponibilidade, caracterizada pelo crescimento nas placas com meio ASW, com destaque para as condições extremas de ausência e alta salinidade.

Segundo Pitt e Hocking (2009), o crescimento de fungos, incluindo *Aspergillus niger*, é altamente dependente da disponibilidade de fontes de carbono, como açúcares simples (glicose e sacarose), que são facilmente metabolizados para produção de energia e biomassa. Esses autores destacam que meios de cultura ricos em açúcares, como o meio Czapek (contendo sacarose) e *Saboraud* (contendo glicose), proporcionam condições ideais para o crescimento fúngico, ademais, a habilidade de *Aspergillus niger* de prosperar em condições de elevada concentração de matéria orgânica, bem como no meio ASW com baixa concentração de glicose (0,5 g/L), pode ser justificada pela adaptabilidade metabólica deste fungo.

De acordo com Papagianni (2007), *Aspergillus niger* dispõe de uma vasta variedade de enzimas extracelulares que lhe possibilitam se ajustar a variadas condições nutricionais, incluindo locais com escassez de carbono. Esta adaptação é vital para a sua sobrevivência em vários habitats, desde solos com alta concentração de matéria orgânica até ambientes mais limitados.

Os resultados indicaram que é viável a escolha do meio ASW (ELG e CAG), apesar do seu baixo conteúdo nutricional, especialmente em relação à fonte primária de carbono (0,5 g/L), uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,292$) entre as concentrações (0,5 g/L *versus* 5 g/L) do mesmo modo que oferta condição de crescimento que em um meio padrão com nutrientes considerados ideais. Além disso, a cepa demonstrou alta tolerância à salinidade de até 30‰, sem comprometimento na velocidade média de

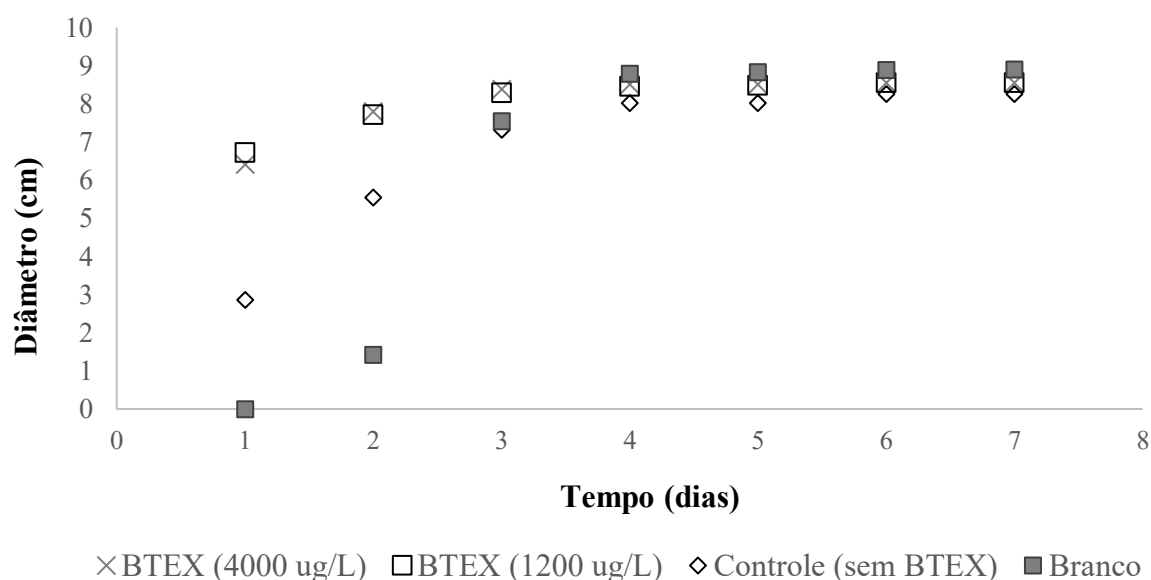
crescimento conforme indicado pelas análises estatísticas ANOVAS nos diferentes grupos. A salinidade influenciou a velocidade de crescimentos dos fungos em ambos os meios, porém no meio *Sabouraud* foi mais evidente ($F=9,52$ e $p= 0,0019$) que no meio Czapec ($F=3,88$ e $p= 0,037$). Dessa forma, os meios ASW ELG 0,5 e ASW CAG 0,5 mostraram-se adequados para o crescimento de *A. niger* AN400 em condições salinas de até 30‰ (m/v) e a elevada capacidade de adaptação da espécie reforça seu potencial para testes de toxicidade com BTEX.

5.2 Teste de Toxicidade a BTEX.

No teste de toxicidade, o *Aspergillus niger* AN400 foi exposto aos meios selecionados a partir do teste de halotolerância, ASW ELG 0,5 e ASW CAG 0,5, contendo diferentes concentrações de BTEX.

A Figura 11 apresenta a variação do diâmetro teórico das colônias de *Aspergillus niger* AN400 cultivadas no meio ASW ELG 0,5, com salinidade de 30‰, ao longo de 7 dias. São comparadas as condições de crescimento na ausência de BTEX (controle), na presença de BTEX nas concentrações de 1200 e 4000 µg/L, além de uma condição sem salinidade e sem BTEX (branco).

Figura 11 — Crescimento das colônias de *Aspergillus niger* AN400, ao longo do tempo de cultivo, em meio de cultura ASW ELG 0,5, com concentração de 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX, como também no meio controle (sem BTEX) e no meio branco (ausência de salinidade e BTEX).



Fonte: Autora (2025)

Na Tabela 6 são apresentados os valores de velocidades médias do crescimento colonial de *A. niger* nas condições de estudadas nas placas de controle (sem BTEX e com 30‰ de salinidade), Branco (sem BTEX e sem salinidade) e nas placas com 30‰ de salinidade e presença de concentrações de 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX.

Tabela 6 — Comparativo de velocidades médias de crescimento do *Aspergillus niger* nos meios ASW EL e ASW CA na presença de concentração 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX e os respectivos desvios padrões.

Placas	Velocidade média (cm/dia)	
	ASW EL	ASW CA
Controle	1,30 ± 0,33	0,32 ± 0,04
Branco	2,74 ± 0,23	2,37 ± 0,08
1200 µg/L por BTEX.	0,67 ± 0,36	0,05 ± 0,01
4000 µg/L por BTEX.	0,41 ± 0,37	1,32 ± 0,43

Fonte: Autora (2025)

No meio ASW ELG 0,5 com salinidade de 30‰ e presença de BTEX, o crescimento do *Aspergillus niger* AN400 apresentou variações consideráveis de acordo com a concentração do contaminante. Na condição Controle (sem BTEX), o crescimento foi progressivo, com velocidade média de 1,30 ± 0,33 cm/dia, alcançando um diâmetro teórico de 8,26 cm no 7º dia. Esse valor indica um desenvolvimento contínuo até a estabilização próxima ao limite da placa de Petri (9 cm).

Por sua vez, as placas Branco (sem salinidade e sem BTEX) apresentaram a maior velocidade média de crescimento (2,74 ± 0,23 cm/dia), com colônias atingindo 8,90 cm no sétimo dia. Esse desempenho confirma que, em condições ideais, sem estressores químicos ou osmóticos, o fungo expressa seu potencial máximo de crescimento radial.

Na presença de 1200 µg/L de BTEX, o fungo apresentou crescimento rápido no primeiro dia (6,72 cm), sugerindo um possível estímulo inicial, conforme relatado por Daâssi e Almaghrabi (2023) e Zhang, Feng e Ren (2024), que descreveram o uso de hidrocarbonetos como fonte alternativa de carbono e estímulo inicial de crescimento em fungos. Apesar da desaceleração posterior, o diâmetro final foi de 8,54 cm no 7º dia, e a velocidade média de crescimento foi de 0,67 ± 0,36 cm/dia, inferior à condição controle. Em concentração mais elevada (4000 µg/L), observou-se padrão semelhante, crescimento inicial expressivo (6,41 cm no 1º dia), com estabilização em 8,54 cm nos dias finais e velocidade média de 0,41 ± 0,37 cm/dia, a menor dentre os tratamentos com BTEX meio ASW ELG 0,5.

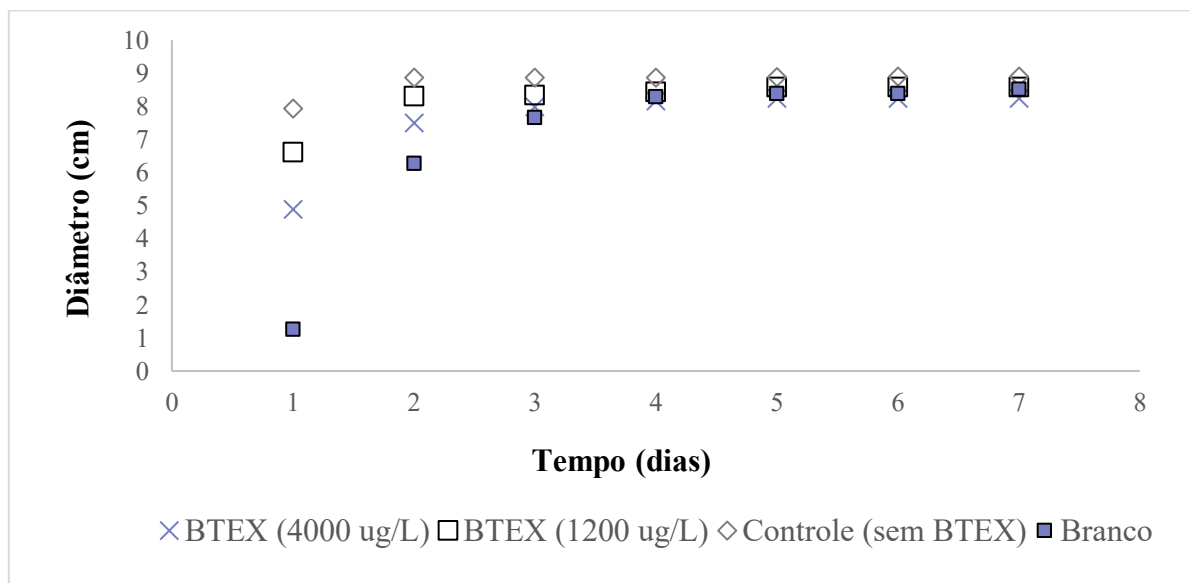
A análise estatística por ANOVA unifatorial revelou diferença estatisticamente significativa entre as condições testadas ($F = 7,64$; $p = 0,0224$), indicando que a concentração de BTEX impactou de forma relevante a velocidade de crescimento fúngico. O teste de Tukey complementou essa análise ao distinguir que o Controle (sem BTEX) foi estatisticamente diferente dos tratamentos com BTEX (1200 e 4000 $\mu\text{g/L}$), classificados no mesmo grupo. Isso demonstra que, embora o fungo tenha mantido crescimento mesmo na presença de BTEX, sua taxa de expansão foi significativamente reduzida em relação à condição sem contaminante.

Por outro lado, o teste de Tukey também revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 1200 e 4000 $\mu\text{g/L}$ de BTEX. Esse resultado sugere que o aumento da concentração de BTEX dentro desse intervalo não resultou em maior inibição do crescimento, possivelmente indicando que o *A. niger* já atinge um limiar de resposta ao composto nessa faixa de concentração, ou que o estresse induzido se estabiliza após certo ponto.

Portanto, os dados demonstram que o *A. niger* AN400 é capaz de crescer mesmo sob exposição a hidrocarbonetos aromáticos em meio salino, embora a presença de BTEX reduza significativamente a velocidade de crescimento em comparação à condição controle. Ainda assim, é possível observar a resistência fúngica do *A. niger* AN400 à ambientes contaminados com compostos BTEX, mesmo em condições adversas como a salinidade elevada.

A Figura 12 apresenta a variação do diâmetro teórico das colônias de *Aspergillus niger* AN400 cultivadas no meio ASW CAG 0,5, com salinidade de 30‰, ao longo de 7 dias, comparando-se as condições de crescimento na ausência de BTEX (controle), na presença de BTEX nas concentrações de 1200 e 4000 $\mu\text{g/L}$, além de uma condição sem salinidade e sem BTEX (branco).

Figura 12 — Crescimento das colônias de *Aspergillus niger* AN400, ao longo do tempo de cultivo, em meio de cultura ASW CAG 0,5, com concentração de 1200 µg/L e 4000 µg/L de BTEX, como também no meio controle (sem BTEX) e no meio branco (ausência de salinidade e BTEX)



Fonte: Autora (2025)

No meio ASW CA com glicose (0,5 g/L) e salinidade de 30‰, o crescimento do *Aspergillus niger* AN400 apresentou comportamento diferenciado de acordo com a presença e concentração de BTEX. O grupo Controle (sem BTEX) demonstrou crescimento progressivo, com diâmetro teórico de 7,92 cm já no 1º dia, atingindo 8,89 cm ao final do experimento. A velocidade média de crescimento foi de $0,32 \pm 0,04$ cm/dia, evidenciando um desenvolvimento moderado em meio salino.

No grupo Branco (sem BTEX e sem salinidade), o crescimento foi retardado, com diâmetro de apenas 1,26 cm no 1º dia e crescimento progressivo até 8,50 cm no 7º dia. A velocidade média de crescimento foi de $2,37 \pm 0,08$ cm/dia, a mais elevada entre os grupos, o que demonstra o efeito estimulador da ausência de estressores, como salinidade e contaminantes tóxicos.

Nas placas com BTEX a 1200 µg/L, o fungo iniciou o crescimento com diâmetro de 6,60 cm no 1º dia, atingindo 8,57 cm no 7º dia. Já na concentração de 4000 µg/L, o crescimento inicial foi um pouco inferior (4,89 cm), mas a colônia rapidamente alcançou 8,23 cm, estabilizando-se a partir do 5º dia. As velocidades médias foram de $0,05 \pm 0,01$ cm/dia para 1200 µg/L e $1,32 \pm 0,43$ cm/dia para 4000 µg/L, indicando um surpreendente aumento do desempenho fúngico na concentração mais elevada de BTEX, sugerindo um possível efeito de adaptação metabólica frente ao contaminante. Esse comportamento

reforça o que foi apontado por Obuekwe *et al.* (2005) que observaram o crescimento de fungos sob estresse salino com petróleo bruto, sugerindo que o poluente pode ser utilizado como fonte suplementar de carbono e energia. Também pode estar relacionado à produção de compostos extracelulares protetores, como apontado por Nesci; Etcheverry; Magan, (2004) que auxiliam na imobilização ou metabolização de substâncias tóxicas.

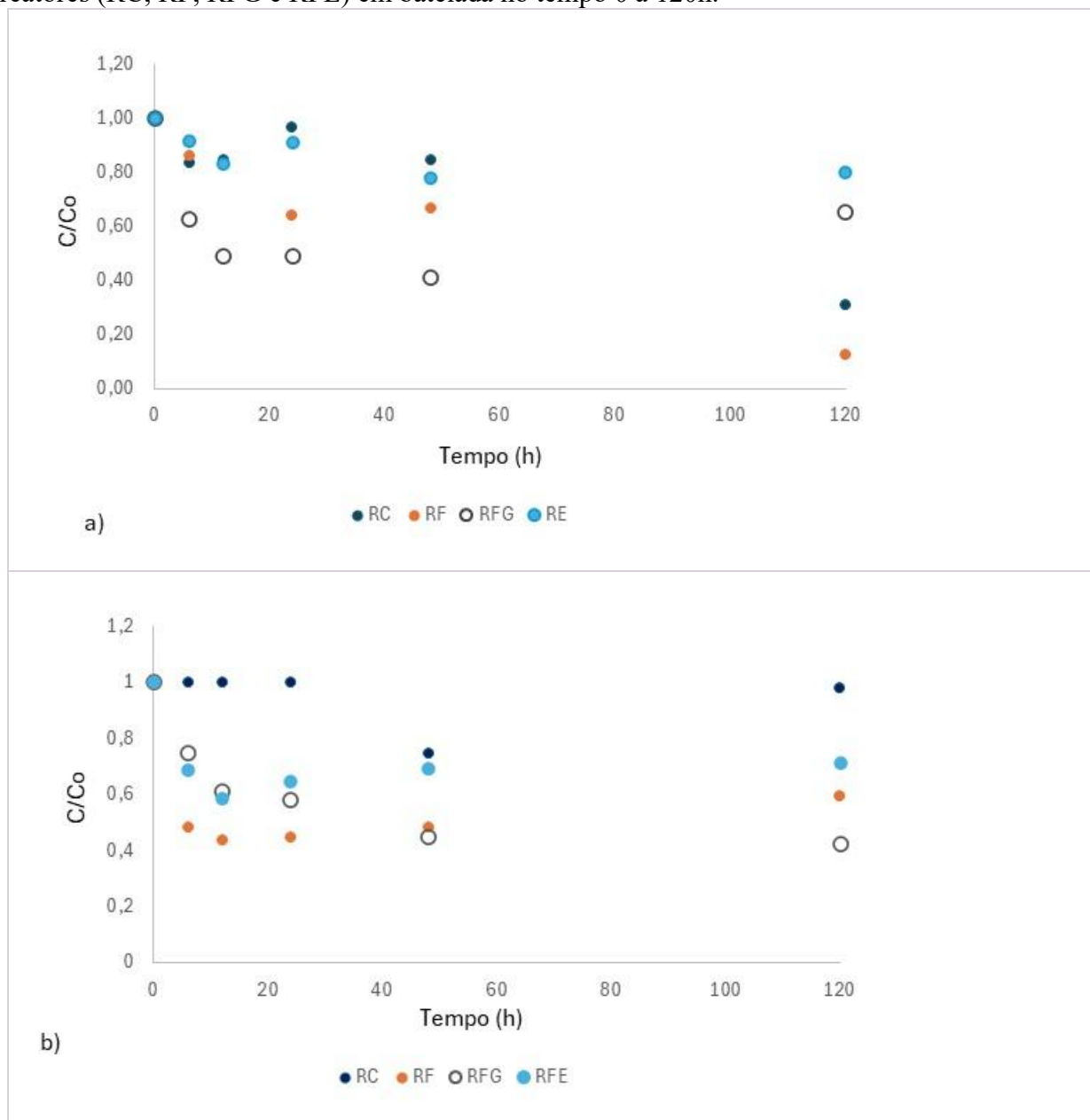
A análise estatística por ANOVA unifatorial indicou que houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de BTEX ($F = 42,99$; $p = 0,0003$). O teste de Tukey revelou que todos os grupos se diferenciaram significativamente entre si. Esses resultados evidenciam que o crescimento do fungo foi diretamente influenciado pela concentração de BTEX no meio, com efeitos distintos de inibição ou estimulação.

Por fim, o crescimento fúngico nos diferentes grupos tendeu à estabilização após o 3º dia, o que pode estar associado ao efeito de borda das placas de Petri, que limita fisicamente a expansão radial da colônia (Mello *et al.* 2018). Ainda assim, o *Aspergillus niger* AN400 demonstrou notável capacidade de tolerar e crescer mesmo na presença de BTEX em meio salino, especialmente na maior concentração testada ($4000 \mu\text{g/L}$) no meio ASW CA, grupo que se destaca com melhor crescimento e diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0003$) em relação a todos os outros grupos, apontando ser o meio aquoso promissor para a próxima etapa de testes em batelada.

5.3 Ensaio com reatores em batelada e biomassa dispersa para remoção de BTEX

Na Figura 13 demonstra a concentração relativa (C/C_0) de DQO bruta e filtrada nos grupos de reatores (RC, RF, RFG e RFE) em batelada ao longo do tempo, como indicativo da matéria orgânica presente no meio, incluindo biomassa (micélio, esporos, fragmentos celulares) e partículas em suspensão, na fração total ou bruta, e matéria orgânica dissolvida, na DQO filtrada.

Figura 13 — Concentração relativa (C/C_0) de DQO filtrada (a) e DQO bruta (b) nos grupos de reatores (RC, RF, RFG e RFE) em batelada no tempo 0 a 120h.



Fonte: Autora (2025).

Nos reatores controles (RC) houve manutenção na maior parte do tempo de valores altos tanto de DQO bruta quanto filtrada ($C/C_0 \sim 1$), como esperado para ausência de microrganismos. Nos reatores com fungos (RF), verificou-se diminuição expressiva dos valores de DQO filtrada, remoção de 87,40% (120 h), ainda que com menor eficiência de remoção em termos de DQO bruta, particularmente nesse mesmo tempo, podendo estar relacionado à presença de biomassa e ou esporos fúngicos nesses reatores. Alvarado *et al.* (2021) em suas pesquisas confirmam que a presença de particulado (biomassa, aglomerados) podem sedimentar, ressuspender e ser hidrolisado, influenciando a DQO bruta.

O desempenho inferior de RFG na fração de matéria orgânica solúvel, 37,25% (120 h) pode estar relacionada com uma repressão catabólica de carbono (CCR), uma vez que a presença de glicose direciona o metabolismo para uma fonte preferencial, reprimindo vias para utilização de substratos mais complexos como compostos aromáticos, podendo ocorrer acúmulo de intermediários solúveis que compõem a DQO filtrada. Em *Aspergillus*, a CCR mediada por CreA/CREA (proteína reguladora) na presença de glicose é amplamente documentada e pode reduzir a expressão de vias catabólicas alternativas (Mäkelä *et al.* 2018; Chen *et al.* 2022b).

Por outro lado, em RF, a diminuição da DQO filtrada foi a de maior percentual (87,40%) no final do experimento. Esse comportamento pode ser explicado pois em RFG e RFE, o fornecimento de fonte de carbono mais fácil de ser assimilada pode ter promovido maior crescimento micelial e estimulado a atividade metabólica para outras vias como a produção de EPS em vez da mineralização completa dos hidrocarbonetos (Chen *et al.* 2022a), sendo que, em termos de DQO bruta, verificou-se que as maiores remoções nos reatores com fungos ocorreram, respectivamente, em RFG (57,8%), RF (40,85%) e RFE (28,78%).

Assim, em RF, a ausência de fonte adicional de carbono pode ter limitado o crescimento celular, o que se refletiu na menor contribuição desta para a DQO bruta. Nessas condições de limitação nutricional, fungos como *Aspergillus niger* tendem a direcionar seu metabolismo para a utilização mais eficiente dos compostos disponíveis, como os hidrocarbonetos aromáticos removendo BTEX, embora de forma mais lenta, o que sugere uma adaptação metabólica para utilizar esses compostos como fontes de energia e carbono sob limitação nutricional (Rodrigues *et al.* 2024; Rodrigues *et al.* 2025). Isso explica a maior remoção observada na fração solúvel da matéria orgânica, refletida pela redução mais expressiva da DQO filtrada.

No reator que recebeu etanol e fungos (RFE), simulando a presença do etanol em proporção similar à presente na gasolina brasileira, a remoção de DQO filtrada foi de apenas 19,87% e a de DQO bruta de 28,78%, o que possivelmente pode ter decorrido de efeito tóxico da combinação dos BTEX e do etanol, além de que este último tende ainda a aumentar a solubilidade dos BTEX, agindo como co-solvente, aumentando a solubilidade aquosa e a mobilidade dos monoaromáticos (efeito *co-solvent*), o que eleva a fração dissolvida disponível para os microrganismos e, portanto, a exposição tóxica potencial. Além disso, estudos mostram que a presença de etanol pode alterar a cinética de degradação dos BTEX, reduzindo o fluxo metabólico por composto (por exemplo, tolueno) quando o

etanol está presente em mistura, efeito que pode decorrer competição por recursos energéticos ou preferência metabólica pelo etanol como substrato, com consequente inibição ou reduzida eficiência na degradação dos aromáticos (Chen *et al.* 2022a; Schneider *et al.* 2024; Zhang *et al.* 2024).

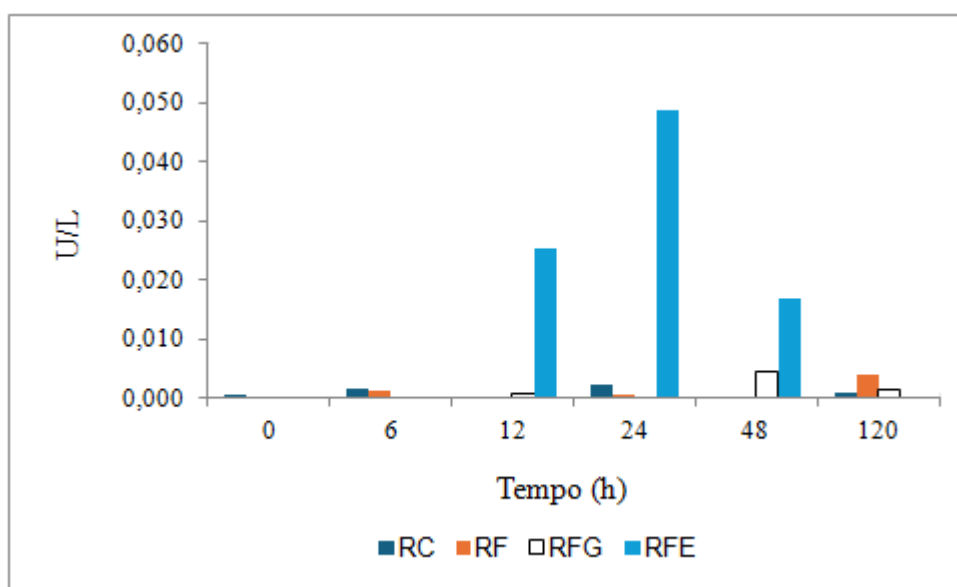
A presença de etanol geralmente altera a dinâmica de degradação de BTEX uma vez que microrganismos tendem a consumir etanol preferencialmente, o que reduz temporariamente a degradação dos aromáticos por dois mecanismos principais: preferência metabólica em que o etanol serve como substrato mais prontamente catabolizável, e competição por oxigênio e nutrientes, já que a oxidação rápida do etanol consome O_2 dissolvido e nutrientes limitantes, reduzindo a disponibilidade para as vias específicas de degradação de BTEX. Além disso, a presença de etanol pode modificar a estrutura da comunidade microbiana e o redox do sistema, favorecendo populações etanol-oxidantes em detrimento dos degradadores de aromáticos, o que prolonga a persistência dos BTEX na matriz aquosa (Chen *et al.* 2022a; Schneider *et al.* 2024).

Adicionalmente, fungos filamentosos como o *A. niger* produzem vários ácidos orgânicos a partir do consumo do substrato inicial (Varriale; Ulber, 2023), o que se reflete no valor e contribui com a matéria orgânica registrada no meio, o que explicaria oscilações de DQO observadas em parte, bem como o fato da DQO filtrada no final da batelada ter sido de valor considerável, enquanto as concentrações de BTEX foram, em sua maioria, inferiores a $1 \mu\text{g/L}$.

Apesar da menor eficiência de remoção de matéria orgânica observada em RFE, dentre os reatores com fungos, esses reatores exibiram a maior atividade enzimática, registrando-se para lacase $0,052 \text{ U/L}$ (24 h), que pode ter sido favorecida pela presença de etanol, indicando resposta metabólica do *Aspergillus niger*, ainda que não tenha se refletido na remoção de matéria orgânica. Isso pode ser justificado pelo fato de que álcool etílico pode induzir expressão e secreção de lacases em fungos, dependendo de condições de nitrogênio e estresse celular. Assim, a presença de etanol no RFE pode elevar a atividade enzimática medida (Bossa *et al.* 2024), sem que isso necessariamente se traduza em mineralização completa da carga orgânica uma vez que exige cooperação entre oxidações extracelulares e metabolismo intracelular (catálise por P450, TCA). Se o etanol for usado preferencialmente, ou se houver limitação de O_2 /nutrientes, a sequência completa que leva à CO_2 é prejudicada, fica muita transformação parcial (polímeros, intermediários), pouco catabolismo final (Huizenga; Semprini, 2023)

Nos reatores RFG e RF as maiores atividades de lacase foram respectivamente de 0,0044 U/L (48 h) e 0,0039 U/L (120 h), verificando-se que a presença de cossubstrato propiciou a ocorrência da atividade enzimática lacase em tempo menor, conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 — Atividade lacase registrada nos reatores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.



Fonte: Autora (2025).

Curiosamente o controle abiótico (RC) apresentou atividade lacase em alguns dos tempos estudados, ainda que com valores muito baixos, atividade máxima de 0,0023 U/L (24 h) o que pode indicar contaminação microbiana desses reatores.

Os reatores RF apresentaram atividade lacase muito baixa antes de 48 h ($\leq 0,0007$ U/L), com a atividade lacase máxima registrada no último dia da batelada, de 0,0039 U/L, como mencionado, o que compatível é com a natureza de metabolismo secundário da enzima, cuja produção costuma ocorrer em fases posteriores do crescimento e é influenciada por disponibilidade de nitrogênio/carbono e presença de indutores aromáticos, explicando a expressão retardada quando não há indutor ou nutriente suplementar disponível (Piscitelli *et al.* 2011).

O estímulo da atividade lacase pela presença de etanol ou glicose, se refletindo em uma indução enzimática rápida e transitória, pode demonstrar que eles são indutores que ativam a secreção da enzima lacase ou sua liberação por permeabilização celular. Revisões

apontam que compostos xenobióticos, como solventes e fenóis, são indutores típicos da produção de lacase, produzindo picos rápidos seguidos de declínio, possivelmente devido à exaustão do indutor ou à instabilidade enzimática (Mate *et al.* 2017).

Em seu trabalho, Wu *et al.* (2019) demonstraram que solventes orgânicos polares, incluindo etanol, podem modificar a atividade lacase em *Trametes versicolor*, observando aumento cerca de 3 vezes após a pré-incubação com etanol, em comparação com o controle que não continha sem solvente orgânico. Além disso, aqueles autores relataram ainda que a melhora da atividade enzimática está associada aos efeitos físicos ou micro ambientais, pois, após a diluição ou remoção do solvente, há uma diminuição da atividade.

Apesar de a glicose ser um cossustrato energético eficiente, sua presença pode ativar o mecanismo de Repressão Catabólica por Carbono (CCR) em fungos filamentosos, mediado pelo fator de transcrição CreA, denominado de fator de transcrição repressivo. Esse sistema reprime a expressão de enzimas extracelulares envolvidas em rotas de degradação secundária, como é o caso da lacase, quando há fontes de carbono facilmente assimiláveis, sendo esse fenômeno demonstrado em *Aspergillus niger*, com a atividade enzimática suprimida em meio rico em glicose (De Assis *et al.* 2021).

Dessa forma, conforme observado na presente pesquisa, a maior atividade lacase registrada nos reatores com etanol (RFE), em comparação com a reportada nos reatores RFG que continham glicose, pode refletir a interação entre indução química por solventes (etanol) e regulação negativa via CCR induzida pela glicose. Esses resultados podem sugerir que a presença de etanol e glicose, nas condições do trabalho, aumentou a liberação de lacase por *A. niger* AN400 nesses reatores em meio ASW com BTEX.

Comparando com a literatura, a atividade lacase obtida no presente trabalho com o comumente reportado na literatura para fungos em presença de hidrocarbonetos/óleo, verificou-se atividades similares no trabalho de Asemoloye *et al.* (2020) que ao usarem *Aspergillus oryzae* e outros isolados de sítios contaminados com hidrocarbonetos relataram atividade lacase máxima de 0,0036 U/L, em 9 dias de cultivo, quando adicionado Cu² e substratos lignocelulósicos como indutores. Da mesma forma, Fu *et al.* (2025) observaram o desenvolvimento de 0,00132 U/L de atividade lacase por *Trichoderma aperellum* Tasjk65 na presença de maltose (pH 6) que seria uma fonte preferencial de carbono, em 120 h de cultivo, mostrando que os valores de atividade enzimática são muito variáveis.

Outrossim, o meio ASW simula a água do mar que é pobre em carbono orgânico dissolvido de fácil assimilação, sendo a fração lábil, presente em mar aberto e disponibilizada para a comunidade heterotrófica, muito baixa (Hansell e Orellana, 2021).

Assim, nessa perspectiva, a atividade de lacase assumiria valores baixos, sendo que a presença de fontes de carbono de fácil assimilação como glicose e extrato de malte, em concentração adequada, contribuem para indução da atividade lacase, assim como fontes de nitrogênio e o pH do meio (Viswanath *et al.* 2014).

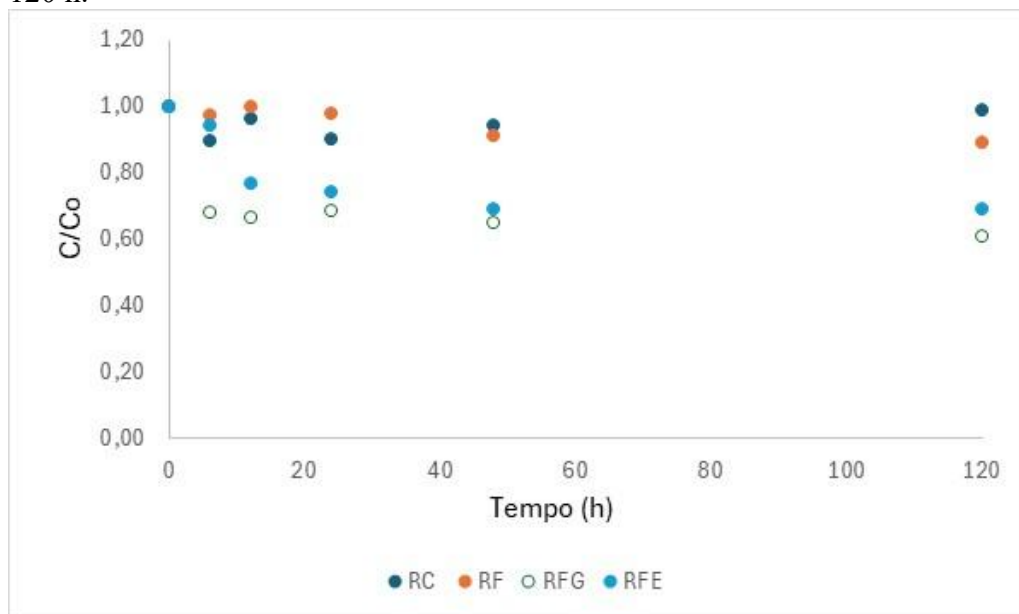
Segundo Debnath e Saha (2020), as condições ótimas para obtenção de maiores atividades de lacase variam muito em função da espécie e do substrato, este que último, por sua vez, influencia ainda a faixa ótima de pH para obtenção de maior produção enzimática, sendo transitória, mantendo-se estável por períodos variáveis (14 a 24 h) ao longo do cultivo, encontrando-se em diferentes condições, em sua revisão literária, atividades lacases variadas para fungos (0,00085 a 2778 U/L).

É importante salientar que os BTEX podem atuar como indutores indiretos (por estresse) ou fornecer moléculas intermediárias que estimulem a atividade de oxidases, favorecendo co-metabolismo por lacase e outras oxido-redutases. Os compostos aromáticos e estressores xenobióticos, frequentemente, modulam expressão e atividade de lacase, assim, na presença de BTEX, especialmente combinado com cossubstratos, é plausível a indução e/ou elevação de lacase pelos microrganismos (Piscitelli *et al.* 2011).

No que se refere à salinidade, *A. niger* apresentou atividade de lacase compatível com relatos de halotolerância em cepas de *Aspergillus* e adaptação enzimática em meios salinos. Pócsi *et al.* (2024) descreveram espécies de *Aspergillus* halotolerantes, concentrações de até 20g/L de NaCl, com capacidade enzimática, facilitando a oxidação ou hidrólise de ligações químicas complexas e promovendo a quebra dos compostos tóxicos sob salinidade.

Ao observar os dados de remoção de fenóis, ficou demonstrado que, na presença de glicose (RFG), quando do registro das maiores atividades lacase, de 0,0044 U/L (48 h) e 0,0016 U/L (120 h), ocorreram as maiores remoções desses compostos, de 35,06% (48 h) 39,4% (120 h), sendo a concentração média inicial de fenóis de 439 mg/L (Figura 15).

Figura 15 — Comportamento da concentração de fenóis registrada nos retores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.



Fonte: Autora (2025).

Assim, a adição de glicose como cossustrato teria contribuído para induzir enzimas oxidativas capazes de degradar fenóis (Bhattacharya *et al.*, 2021). A glicose também favorece co-metabolismo de aromáticos por *Aspergillus*, acelerando o “puxo” energético para rotas que convertem fenóis a produtos menos tóxicos ou à mineralização. Estudos com *A. niger* mostram degradação efetiva de fenol em batelada e em efluentes industriais quando há condições nutricionais adequadas (Sharma; Gupta 2012; Tebbouche *et al.* 2016; Khalil *et al.* 2021).

Observou-se ainda que a alta concentração de hidrocarbonetos presente no meio (~6000 mg/L) pode ter ainda exercido efeito tóxico sobre os fungos, influenciando os valores de lacase registrado. Zafra *et al.* (2015) relataram efeitos morfológicos e diminuição do crescimento de fungos filamentosos quando expostos a frações de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) entre 4000 e 6000 mg/L, apresentando alterações no crescimento e na morfologia que se intensificaram na medida que os compostos estavam em maior concentração no meio, indicando que nessas concentrações houve estresse microbiano e comprometimento do crescimento micelial, com possível retenção da enzima na biomassa ou partículas formadas por polimerização fenólica, atividade não detectada no sobrenadante, subestimando a atividade total (Mekonnen; Aragaw; Genet, 2024).

Na presente pesquisa, o controle abiótico (RC) manteve concentração de fenóis com pouca oscilação ao longo do tempo. Nos reatores bióticos o comportamento quanto à remoção de fenóis pode ser associado à ação de enzimas oxidativas como a lacase que oxida fenóis e contribui para redução da fração solúvel de compostos aromáticos (Asemoloye *et al.* 2020; Diefenbach, *et al.* 2024).

As vias aeróbias de degradação dos compostos BTEX iniciam-se tipicamente por hidroxilação da estrutura aromática, catalisada por mono-oxigenases como benzene/toluene monooxygenases ou citocromo P450, originando álcoois e fenóis (como fenol e cresóis) como intermediários imediatos. Em seguida, esses fenóis são convertidos em catecóis por hidroxilases, que sofrem clivagem orto- ou meta-dioxygenásica, produzindo ácidos alifáticos que entram no ciclo do TCA e levam à mineralização completa. Assim, a formação de fenóis representa um passo-chave na rota aeróbia de degradação de BTEX, já confirmada por análises bioquímicas e genômicas (Sathesh-Prabu *et al.* 2023).

Mindubaev *et al.* (2024) endossaram ainda em seu trabalho com várias espécies *Aspergillus* que o gênero tem capacidade para degradar hidrocarbonetos de forma mais eficiente quando há co-metabolismo, com presença de uma fonte extra de carbono, sendo que, na ausência dela, a rota pode estacionar ou mesmo acumular intermediários fenólicos.

De fato, nos reatores com fungos e sem suplementação (RF), a maior remoção de fenóis foi de 10,80%, enquanto no reator com glicose (RFG) e etanol (RFE) as remoções foram melhores. Em RFE, foi obtido remoção de 31%, no último dia, sugerindo o papel estimulador do etanol como indutor, embora sua eficácia seja menor que a da glicose, considerando que em RFG a remoção de fenóis foi maior (39%), no que o efeito tóxico do etanol sobre os fungos possa ser considerado, já que sua eficácia como cossubstrato é associado à sua concentração no meio, pois, em concentrações moderadas, a glicose pode induzir expressão enzimática, mas em concentrações elevadas ou sob condições de estresse como a salinidade e limitação de O₂, podem provocar efeitos inibitórios sobre o crescimento e a atividade enzimática ou ainda reduzir a estabilidade das enzimas por efeitos de solvência (Bossa *et al.*, 2024), o que pode explicar o desempenho ligeiramente inferior dos reatores RFE em relação aos RFG na remoção de fenóis.

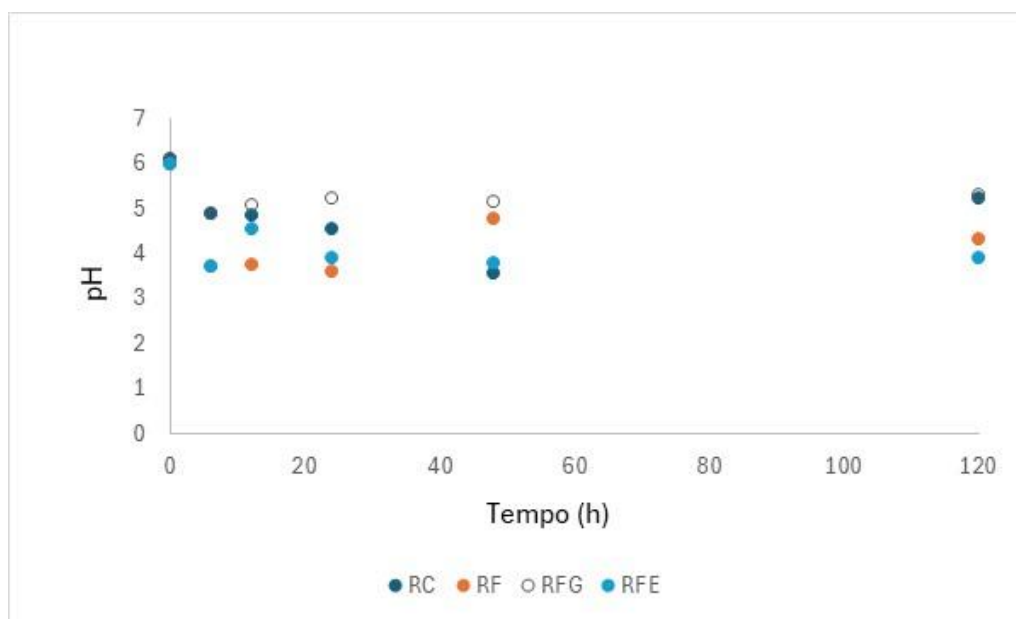
Estudo de Junior *et al.* (2020) sugere que concentrações moderadas de etanol ~ 1 a 3% (v/v), correspondendo de 10 a 30 g/L, ou ainda menores, em função da densidade são suficientes para induzir atividade de lacase em fungos, e podem resultar em valores elevados, como os alcançados por *Pleurotus sajor-caju*, com 1 a 2% etanol (v/v), de 237 a 364 U/L, enquanto em concentrações de 3% (v/v) já sofreram efeitos da toxicidade do etanol

que reprimiu totalmente a produção de lacase. Para *Pycnoporus sanguineus*, 0,3 a 0,4% (v/v) de etanol, combinados com extrato de levedura (2 g/L) resultaram em 31 U/L de lacase, mas concentrações maiores ou uso de fontes de nitrogênio mais simples reduziram drasticamente essa atividade a valores inferiores a 1,6 U/L (Hernández *et al.* 2015).

O etanol foi usado no presente trabalho a 30% (v/v), valor substancialmente mais elevado do que os anteriormente mencionados como indutoras, indicando que o fungo esteve sob condição de concentração elevada, provavelmente explicando a atividade de lacase registrada ter sido muito baixa em comparação as registradas por Junior *et al.* (2020) e Hernández *et al.* (2015), ainda que tenha sido observada diminuição de fenóis.

As lacases fúngicas oxidam um amplo espectro de fenólicos o que reforça o nexo entre picos de atividade oxidativa e diminuições subsequentes da concentração de fenóis, observados em RFG e RFE, além disso, os valores absolutos de atividade variam dependendo de condições como o tipo de cultivo, salinidade e fontes de carbono, indicando que esses fatores influenciam significativamente a eficiência das lacases na degradação de fenólicos (Loi *et al.* 2021). No que se refere a monitoramento de pH, os valores obtidos dessa variável durante a batelada nos reatores de controle (RC) e com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e fungos e etanol (RFE) são apresentados na Figura 16.

Figura 16 — Variação de pH registrada nos reatores em batelada – controle (RC), com fungos (RF), com fungos e glicose (RFG) e com fungos e etanol (RFE) – adicionados de BTEX (6000 mg/L), ao longo de 120 h.



Fonte: Autora (2025).

A maioria dos reatores apresentaram diminuição do pH, mais acentuada nos que continham fungo, refletindo a produção de ácidos orgânicos. A acidificação no RF coincidiu com o pico tardio de lacase em 120 h, podendo ser decorrente da geração de subprodutos associados ao metabolismo secundário, induzido por condições de estresse e baixa disponibilidade de carbono (Zhang *et al.* 2024). O pH nos reatores RFG manteve-se estável, com ligeira tendência à acidificação, o que pode refletir o balanço entre a produção de ácidos orgânicos típicos de *A. niger* e o consumo de prótons associado ao metabolismo ativo de glicose (Magnuson *et al.* 2016). Já em RFE, de modo geral, os valores de pH foram menores, o que pode estar associada ao fato de que o etanol, ao ser oxidado, gera ácidos como o acético, mantendo o meio mais ácido (Hernández *et al.* 2015).

As análises de BTEX revelaram que, em 120 h, sua concentração nos reatores era inferior a 1 µg/L, com exceção de RF e RC que para m,p-xileno apresentaram nesse tempo, respectivamente, 6,9 µg/L e 27,3 µg/L. Estudos como o de Kong; Mat; Yunus, (2025), Huang *et al.* (2022) e Catherine *et al.* (2016) mencionam sobre sorção hidrofóbica e retenção transitória, em que os BTEX apresentam afinidade por substâncias poliméricas extracelulares (EPS)/biomassa e por superfícies orgânicas do reator, reduzindo a fração dissolvida. No trabalho de Rodrigues *et al.* (2025) o benzeno foi encontrado como o único composto adsorvido no micélio fúngico, com $1,50 \pm 0,19$ a $13,35 \pm 4,72$ mg/g de biomassa, reforçando o papel da adsorção como um mecanismo importante na remoção de BTEX pelo *Aspergillus niger*.

Além disso, a ausência de BTEX quantificáveis em RFG e RFE podem ser compatíveis com remoção por biodegradação fúngica combinada a processos físico-químicos (sorção/volatilização) em meio salino, fenômenos amplamente descritos para fungos filamentosos e, em particular, para linhagens halotolerantes de *Aspergillus* e fungos de podridão-branca (Priyanka; Lens, 2022; Rodrigues *et al.* 2025).

Asemoloye *et al.* (2020) relataram que fungos, como *Aspergillus spp.*, têm capacidade comprovada de remover BTEX, relatando remoções elevadas, de 70% a 95%, especialmente em ensaios em batelada ou consórcios fungo-bactéria e quando há cossustratos ou condições otimizadas. Entretanto, alcançar concentrações aquosas residuais tão baixas quanto < 1 µg/L é difícil na literatura fúngica recente, uma vez que depende da concentração inicial, da volatilização/sorção e do limite de quantificação do método analítico.

Usman, Atta e Tijjani (2020) obtiveram a partir de 2150 mg/L de cada BTEX, em 25 dias de cultivo em reatores em batelada (5 mL), sob agitação orbital (180 rpm), remoções

elevadas de 89,1% por *Aspergillus terreus*, no último dia. Embora os autores não tenham aferido sobre as parcelas de perdas por sorção e volatilização em seu experimento, e como no presente estudo, alcançou-se em tempo reacional menor (120 h), uma remoção de BTEX à nível não detectável, não se pode desprezar as contribuições de perdas por sorção e/ou volatilização, ainda que estas não tenham sido mensuradas no experimento. Cabe ainda endossar que, especificamente no caso de RC, há a suspeita de que possa ter ocorrido contaminação, haja vista nesses reatores ter se detectado atividade lacase.

É interessante observar que a manutenção de BTEX em solução aquosa é frequentemente instável devido às elevadas constantes de Henry e à forte volatilidade desses compostos aromáticos. Assim, uma fração significativa tende a migrar para o *headspace* em reatores com espaço morto, agitação ou aumento de temperatura, promovendo perdas rápidas da fração dissolvida (Wang; Bian; Ruan, 2024). Falabella e Teja (2008) acrescentou que, na presença de sais como o NaCl, ocorre o chamado efeito *salting-out*, que eleva o coeficiente de Henry e reduz a solubilidade dos BTEX, favorecendo sua partição para a fase gasosa e, conseqüentemente, a volatilização. Esses aspectos reforçam que a remoção por volatilização não pode ser descartada.

Em ensaios com isolados fúngicos de solos contaminados, observou-se remoção quase total de BTEX em concentrações de até 1 a 2% (v/v), mas com dificuldade de manter o BTEX dissolvido em níveis mais elevados, possivelmente devido à volatilização, toxicidade ou sorção (Shekari; Mohammadi; Zarrini, 2025). De forma semelhante, estudos com águas subterrâneas contaminadas por gasolina com alto teor de etanol indicaram que o etanol pode inicialmente aumentar a dissolução de BTEX, mas também acelerar sua perda por volatilização e diluição física, resultando em decréscimo da fração dissolvida ao longo do tempo (Rama *et al.* 2019). Essas vias ajudam a explicar por que concentrações aquosas de BTEX podem atingir níveis abaixo do limite de quantificação, mesmo havendo ainda carga residual no sistema. Ainda assim, não se pode descartar a contribuição de processos biológicos, especialmente nos reatores bióticos, considerando os indícios de biodegradação fúngica observados por meio da atividade enzimática e dados de fenóis e de matéria orgânica dissolvida.

Ressalta-se ainda que o aparecimento tardio de m,p-xileno em RF, no tempo de 120 h, foi compatível com o trabalho de Wang *et al.* (2024) em que os xilenos apresentaram maior recalcitrância relativa em comparação a B/T/E, nas condições do estudo, podendo traços residuais persistirem e aparecer tardiamente. Além do mais pode ter ocorrido dessorção tardia para a fase aquosa de compostos previamente adsorvidos na biomassa ou

biofilme gerando valores > LOQ mesmo após leituras iniciais < 1 µg/L (Kong; Mat; Yunus, 2020; Huang *et al.* 2022).

Particularmente, nos reatores com cossustratos, a atividade de lacase foi mais elevada e os fenóis solúveis mais baixos, resultado do papel da lacase na oxidação/polimerização de fenóis, o que deve ter colaborado com a remoção da DQO filtrada nesses reatores, mas mantendo a DQO bruta com valores mais elevados dentre os reatores bióticos à formação de macromoléculas e biomassa (Viswanath *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2024). A remoção de fenóis também diminui inibição metabólica, permitindo maior fluxo catabólico em compostos aromáticos (Al-khalid; El-naas, 2012).

A maior remoção de DQO filtrada observada em RF (87,40%), associada a uma menor remoção de fenóis (10,30%), sugere que, nesse reator, a biodegradação de BTEX tenha ocorrido de forma parcial, possivelmente com acúmulo de intermediários solúveis. Em contrapartida, nos reatores com cossustratos, embora a remoção de DQO filtrada tenha sido menor, houve maior remoção de fenóis, indicando rotas metabólicas distintas e formação de subprodutos não quantificados, como quinonas e outros derivados aromáticos oxidados, os quais contribuem para a DQO filtrada, mas não são detectados nas análises de fenóis (Athanasίου *et al.* 2024).

Dessa forma, a análise integrada das variáveis DQO filtrada, atividade de lacase e fenóis confirma a ocorrência de metabolismo fúngico ativo nos reatores bióticos. Assim, a redução dos BTEX a concentrações inferiores a 1 µg/L ao final do ensaio deve ser interpretada como resultado da atuação sinérgica de processos biológicos e físico-químicos, incluindo biodegradação, sorção e volatilização. Tal comportamento é consistente com o observado na literatura e reforça que, em sistemas reais, a remoção de BTEX raramente pode ser atribuída a um único mecanismo, sendo desejável, em estudos futuros, a inclusão de controles específicos de volatilização, análise da fração particulada e balanço de massa para discriminar quantitativamente cada via de remoção.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

- *Aspergillus niger* AN400 apresentou capacidade crescer nos meios salinos propostos em concentrações de NaCl de até 30‰ sem comprometer seu crescimento radial de suas colônias em placas de Petri;
- Mesmo em condições de baixa disponibilidade de carbono (0,5 g/L de glicose), a cepa manteve velocidades de crescimento consistentes em meio ASW superiores ($2,17 \pm 0,26$ CA; $2,96 \pm 0,03$ EL) às obtidas em meios ricos em nutrientes como Czapek ($0,47 \pm 0,10$) e *Sabouraud* ($1,00 \pm 0,07$), todos na condição de maior salinidade (30‰).
- Ainda no teste em placas em meio salino, *A. niger* AN400 demonstrou resistência a concentrações de BTEX até 4000 µg/L, sem inibição do crescimento, com maior velocidade de crescimento ($1,32 \pm 0,43$), em meio ASW com cloreto de amônio em comparação com os demais.
- Nos reatores em batelada, o desempenho de *Aspergillus niger* AN400 em meio salino com BTEX, a adição de glicose favoreceu maior remoção de fenóis, embora sob menor indução de lacase devido à repressão catabólica, enquanto o etanol estimulou a atividade oxidativa contribuindo para a oxidação de fenóis. Na ausência de cossustratos, observou-se maior direcionamento do metabolismo secundário para a degradação da fração solúvel de DQO, confirmando a versatilidade metabólica da cepa em condições limitantes.
- No último dia de batelada (120 h), as concentrações de BTEX apresentaram-se abaixo do limite de quantificação (< 1 µg/L) na maior parte dos reatores, com exceção de traços de m, p-xileno detectados em RC e RF.
- A ação microbiana sobre os poluentes foi endossada pela diminuição de matéria orgânica dissolvida e fenóis e a atividade lacase registrada;
- As oscilações da DQO bruta e seus valores superiores à de DQO filtrada foi atribuída à formação de biomassa.

7 RECOMENDAÇÕES

Na pesquisa comprovou-se a viabilidade de *A. niger* AN400 em meio salino e sua capacidade de metabolizar fenóis e BTEX com estímulo enzimático influenciado pela presença de cossustrato no meio, recomendando-se o aprofundamento de estudos futuros em estudos de mecanismos de biodegradação, volatilização e adsorção e a ampliação dos estudos enzimáticos, com determinação de outras enzimas que possam estar sendo produzidas no meio e de atuação em processos biodegradativos, bem como a aplicação de reatores com biomassa imobilizada.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Salwa M. et al. Assessment of biochemical biomarkers and environmental stress indicators in some freshwater fish. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 46, n. 11, p. 464, 2024.

ABDELHAMID, Cilia et al. Produced water treatment technologies: A review. **Energies**, v. 18, n. 1, p. 63, 2024.

AHMADUN, F. et al. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 170, p. 530–551, 2009.

AHMED, Temoor et al. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. **Environmental science and pollution research**, v. 25, p. 7287-7298, 2018.

AKHTAR, Nahid; MANNAN, M. Amin-ul. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. **Biotechnology reports**, v. 26, p. e00452, 2020.

AKINSANYA, Bamidele et al. *Aspidogastrea africanus* Infections, comparative assessment of BTEX and heavy metals Bioaccumulation, and histopathological alterations as biomarker response in *Chrysichthys nigrodigitatus* (Lacépède, 1803) of Lekki Lagoon, Nigeria. **Scientific African**, v. 3, p. e00060, 2019.

AL-GHOUTI, Mohammad A. et al. Produced water characteristics, treatment and reuse: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 28, p. 222-239, 2019.

ALHARBI, Nada K. et al. Transcriptome profiling reveals differential gene expression of laccase genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during biodegradation of crude oil. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 564, 2022.

AL-KHALID, Taghreed; EL-NAAS, Muftah H. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 16, p. 1631-1690, 2012.

ALVARADO, Alondra et al. Hydrolysis of particulate organic matter from municipal wastewater under aerobic treatment. **Chemosphere**, v. 263, p. 128329, 2021.

ALVARENGA, Natália et al. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. **Chemosphere**, v. 117, p. 47-52, 2014.

AL-ZABAN, Mayasar I.; ALHARBI, Maha A.; MAHMOUD, Mohamed A. Hydrocarbon biodegradation and transcriptome responses of cellulase, peroxidase, and laccase encoding genes inhabiting rhizospheric fungal isolates. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2083-2090, 2021.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the*

Examination of Water and Wastewater. 24. ed. Washington, D.C.: APHA, AWWA, WEF, 2022.

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

ANIGILAJE, Emmanuel Ademola; NASIR, Zaheer Ahmad; WALTON, Christopher. Exposure to benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) at Nigeria's petrol stations: a review of current status, challenges and future directions. **Frontiers in Public health**, v. 12, p. 1295758, 2024.

APOSTICĂ, Alexandra Georgiana et al. Simple and rapid spectrophotometric method for phenol determination in aqueous media. **Bull Polytech Inst Iași Chem Chem Eng Sect**, v. 64, p. 9-18, 2018.

ASEMOLOYE, Michael Dare et al. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from nigerian crude oil-polluted sites. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1912, 2020.

ASEMOLOYE, Michael Dare et al. Mediatonal influence of spent mushroom compost on phytoremediation of black-oil hydrocarbon polluted soil and response of *Megathyrus maximus* Jacq. **Journal of environmental management**, v. 200, p. 253-262, 2017.

ASEMOLOYE, Michael Dare; AHMAD, Rafiq; JONATHAN, Segun Gbolagade. Synergistic action of rhizospheric fungi with *Megathyrus maximus* root speeds up hydrocarbon degradation kinetics in oil polluted soil. **Chemosphere**, v. 187, p. 1-10, 2017.

ASEMOLOYE, Michael Dare; CHUKWUKA, Kanayo Stephen; JONATHAN, Segun Gbolagade. Spent mushroom compost enhances plant response and phytoremediation of heavy metal polluted soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 183, n. 4, p. 492-499, 2020.

ATANASOVA, Nikolina et al. Plastic degradation by extremophilic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5610, 2021.

ATHANASIOU, Panagiotis E. et al. Laccase-mediated oxidation of phenolic compounds from wine lees extract towards the synthesis of polymers with potential applications in food packaging. **Biomolecules**, v. 14, n. 3, p. 323, 2024.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for benzene*. Atlanta: U.S. Dept. of Health and Human Services, 2007.

ATSDR. *Total Petroleum Hydrocarbons*. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=424&tid=75>. Acesso em: 13 out. 2024.

ATSDR. *Toxicological profile for toluene*. U.S. Public Health Service, 2017.

AYACH, Jana et al. Comparing conventional and advanced approaches for heavy metal removal in wastewater treatment: an in-depth review emphasizing filter-based strategies. **Polymers**, v. 16, n. 14, p. 1959, 2024.

BAIRD, Colin. *Química Ambiental*. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BALA, Saroj et al. Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. **Toxics**, v. 10, n. 8, p. 484, 2022.

BASAK, Pijush; BISWAS, Arpita; BHATTACHARYYA, Maitree. Exploration of extremophiles genomes through gene study for hidden biotechnological and future potential. In: **Physiological and biotechnological aspects of extremophiles**. Academic Press, 2020. p. 315-325.

BERMÚDEZ, Victória Maura Silva et al. Estudo da degradação do paraquat em regime de batelada agitada inoculados com *phanerochaete chrysosporium* com adição de glicose ou sacarose. **Revista aedis de ingeniería y ciencias ambientales: investigación, desarrollo y práctica**, p. 432-452, 2019.

BHATTACHARYA, Sourav et al. Co-substrate-mediated utilization of high concentration of phenol by *Aspergillus niger* FP7 and reduction of its phytotoxicity on *Vigna radiata* L. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 45, p. 64030-64038, 2021.

BHOWMICK, Kuheli et al. Potential microbes in bioremediation: A review. **Materials Today Sustainability**, v. 28, p. 101032, 2024.

BIROLI, Willian G. et al. Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. **Marine Pollution Bulletin**, v. 129, n. 2, p. 525-533, 2018.

BOSSA, Marianela et al. Fungal laccases and Fumonisin decontamination in co-products of bioethanol from maize. **Toxins**, v. 16, n. 8, p. 350, 2024.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis(ANP). *Resoluções e especificações técnicas de combustíveis (2020–2023)*. Rio de Janeiro: ANP, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br>. Acesso em: 25 set. 2025.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução nº 40, de 25 de outubro de 2013. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 20 abr. 2013.

BRASIL. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). *Relatórios técnicos do setor de combustíveis e energia: 2022–2023*. Brasília: EPE, 2023. Disponível em: <https://www.epe.gov.br>. Acesso em: 25 set. 2025.

BUSWELL, JOHN A. Fungal biodegradation of chlorinated monoaromatics and BTEX compounds. In: **British Mycological Society Symposium Series**. 2001. p. 113-135.

BUSWELL, John A.; CAI, Yijin; CHANG, Shu-ting. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. **FEMS microbiology letters**, v. 128, n. 1, p. 81-87, 1995.

CÁCERES-ZAMBRANO, Jessica Zerimar et al. Biodegradation capabilities of filamentous fungi in high-concentration heavy crude oil environments. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 3, p. 123, 2024.

CAI, Li-Nian et al. Halo-tolerant and thermostable mechanisms of an endoglucanase from marine *Aspergillus niger*. **Authorea Preprints**, 2024.

CALABRESE, Edward J. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine: Re-framing the dose–response relationship. **EMBO reports**, v. 5, n. S1, p. S37-S40, 2004.

CALIFORNIA AIR RESOURCES BOARD (ARB). *California Multimedia Evaluation of E11–E15 Gasoline-Ethanol Blends — Tier I Report*. Sacramento: California Environmental Protection Agency, 2020.

CAO, Xiaoqing et al. Efficient pollutants removal and microbial flexibility under high-salt gradient of an oilfield wastewater treatment system. **Science of the Total Environment**, v. 823, p. 153619, 2022.

CATHERINE, Hautphenne; PENNINCKX, Michel; FRÉDÉRIC, Debaste. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 5, p. 250-266, 2016.

CHEN, Tianyu et al. Assessing the biodegradation of btex and stress response in a bio-permeable reactive barrier using compound-specific isotope analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 14, p. 8800, 2022a.

CHEN, Yingying et al. Carbon catabolite repression governs diverse physiological processes and development in *Aspergillus nidulans*. **MBio**, v. 13, n. 1, p. e03734-21, 2022b.

CHIRA, Pedro et al. Groundwater Contamination by Gas Stations in Two Eastern Amazonian Towns (Northern Brazil). **Applied Sciences**, v. 14, n. 13, p. 5529, 2024.

COSTA, A. S. et al. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, v. 105, p. 31–39, 2012.

DA SILVA, Nickolas Menezes et al. Genome sequencing of *Cladophialophora exuberans*, a novel candidate for bioremediation of hydrocarbon and heavy metal polluted habitats. **Fungal Biology**, v. 127, n. 5, p. 1032-1042, 2023.

DAÂSSI, Dalel; ALMAGHRABI, Fatimah Qabil. Petroleum-degrading fungal isolates for the treatment of soil microcosms. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1351, 2023.

DACCÒ, C. et al. Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104866, 2020.

DE ASSIS, Leandro José et al. Carbon catabolite repression in filamentous fungi is regulated by phosphorylation of the transcription factor CreA. **MBio**, v. 12, n. 1, p. 10.1128/mbio. 03146-20, 2021.

DE LA CRUZ-IZQUIERDO, R. I. et al. Analysis of phenanthrene degradation by Ascomycota fungi isolated from contaminated soil from Reynosa, Mexico. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 542-555, 2021.

DE LEÓN, Lyselle Ruíz et al. Polyextremotolerant, opportunistic, and melanin-driven resilient black yeast *Exophiala dermatitidis* in environmental and clinical contexts. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 6472, 2025.

DEBNATH, Rinku; SAHA, Tanima. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101645, 2020.

DIEFENBACH, Thore et al. Laccase-mediated degradation of petroleum hydrocarbons in historically contaminated soil. **Chemosphere**, v. 348, p. 140733, 2024.

DINAKARKUMAR, Yuvaraj et al. Fungal bioremediation: An overview of the mechanisms, applications and future perspectives. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 6, p. 293-302, 2024.

DOHERTY, Funmilayo V. et al. Histopathological Biomarkers of Exposure to Monocyclic Aromatic Hydrocarbons in *Clarias Gariepinus* (African Catfish). **Journal of Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 34-44, 2019.

DONATI, Edgardo Rubén et al. Recent advances in bioremediation/biodegradation by extreme microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1851, 2019.

DONG, Yanzhu et al. Chronic oiling in global oceans. **Science**, v. 376, n. 6599, p. 1300-1304, 2022.

DRIOLI, E.; GIORNO, L. Extremophilic life in our oceans as models for astrobiology. In: [AUTOR(ES)/ORG(s)]. *Extremophiles as astrobiological models*. [S. l.]: Springer, 2018. p. 161–182.

DUTTA, Bhramar; BANDOPADHYAY, Rajib. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 75, 2022.

EDBEIB, Mohamed Faraj; WAHAB, Roswanira Abdul; HUYOP, Fahrul. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-23, 2016.

EL-NAAS, Muftah H.; ACIO, Janice A.; EL TELIB, Ayat E. Aerobic biodegradation of BTEX: progresses and prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 1104-1122, 2014.

ELSHAFEI, Ali Mohamed; MANSOUR, Rawia. Microbial bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. **Discover Soil**, v. 1, n. 1, p. 9, 2024.

FALABELLA, James B.; TEJA, Aryn S. Air–water partitioning of gasoline components in the presence of sodium chloride. **Energy & fuels**, v. 22, n. 1, p. 398-401, 2008.

FERREIRA, M. L. et al. Contaminação por BTEX em águas subterrâneas: estudo de caso em São Paulo. *Revista Brasileira de Engenharia Ambiental*, v. 24, n. 3, p. 215-229, 2020.

GABARDO, I. T. *Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar*. 2007.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

GODAMBE, T.; FULEKAR, M. Bioremediation of petrochemical hydrocarbons (BTEX)—Review. **Journal of Environmental Science and Pollution Research**, v. 3, n. 3, p. 189-199, 2017.

GOLDMANN, Jennifer et al. Development of a chemically defined medium for *Paenibacillus polymyxa* by parallel online monitoring of the respiration activity in microtiter plates. **BMC biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 25, 2023.

GOMES, Karen Jamile Moreira et al. Evaluation of the contamination of the subsurface and groundwater by monoaromatic hydrocarbons in an eastern Amazonian town in northern Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 82, n. 1, p. 23, 2023.

GRIFFIN, D. H. *Fungal physiology*. 2. ed. New York: John Wiley, 1994. 428 p.

GROUND WATER PROTECTION COUNCIL (GWPC). *Produced Water Volumes and Management Practices in 2021*. Oklahoma City: GWPC, 2021. Disponível em: <https://www.gwpc.org/resources/produced-water-volumes-and-management-practices>. Acesso em: 24 set. 2025.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, W. S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 459-464, 1999.

GUNDE-CIMERMAN, Nina; PLEMENITAŠ, Ana; OREN, Aharon. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 3, p. 353-375, 2018.

HAMAD, Asmaa A. et al. Petroleum hydrocarbon bioremediation using native fungal isolates and consortia. **The Scientific World Journal**, v. 2021, n. 1, p. 6641533, 2021.

HAN, Jiandong et al. Effects of different carbon and nitrogen ratios on yield, nutritional value, and amino acid contents of *Flammulina velutipes*. **Life**, v. 14, n. 5, p. 598, 2024.

HAN, Lu et al. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of para-xylene and neuroprotection by gluconolactone in *Xenopus laevis*. **Environmental Pollution**, p. 126756, 2025.

HANSELL, Dennis A.; ORELLANA, Mónica V. Dissolved organic matter in the global ocean: A primer. **Gels**, v. 7, n. 3, p. 128, 2021.

HASHEMI, Fallah et al. Prenatal Exposure to benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) and the Risk of Autism Spectrum Disorders in Children Aged 16 to 37 Months: A Prospective Cohort Study. **Environmental Pollution**, p. 126700, 2025.

HERNÁNDEZ, Christian A. et al. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 327-332, 2015.

HILSDORF, Jorge Wilson; DELEO DE BARROS, Newton; TASSINARI, Celso Aurélio; COSTA, Isolda. *Química tecnológica*. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2004. ISBN 978-8522103522.

HMAD, Ines Ben; GARGOURI, Ali. Halophilic filamentous fungi and their enzymes: potential biotechnological applications. **Journal of Biotechnology**, v. 381, p. 11-18, 2024.

HOYOS, Laura V. et al. Tailored culture strategies to promote antimicrobial secondary metabolite production in *Diaporthe caliensis*: a metabolomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 328, 2024.

HU, Feng et al. Glucose as a Dual-functional Co-substrate in Intimately Coupled Photocatalysis and Biodegradation Systems: Synergistic Enhancement of Refractory Organics Mineralization and Nitrate Removal. *Journal of Hazardous Materials*, p. 138975, 2025.

HU, Lei et al. Toxicological characterization of produced water from the Permian Basin. **Science of the Total Environment**, v. 815, p. 152943, 2022.

HUANG, Lei et al. A review of the role of extracellular polymeric substances (EPS) in wastewater treatment systems. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 19, p. 12191, 2022.

HUIZENGA, Juliana M.; SEMPRINI, Lewis. Influence of growth substrate and contaminant mixtures on the degradation of BTEX and MTBE by *Rhodococcus rhodochrous* ATCC strain 21198. **Biodegradation**, v. 34, n. 5, p. 461-475, 2023.

IARC – International Agency for Research on Cancer. *Benzene – Monograph 120*. Lyon: WHO, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Localidades afetadas*. [S.l.]: IBAMA, 2019. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2019/manchasdeoleo/2019-11-24_LOCALIDADES_AFETADAS.pdf. Acesso em: 27 nov. 2024.

JANSEN, M. L. A. et al. The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is controlled by glucose sensing and signaling. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 6863, 2018.

JEONG, Sun-Wook; CHOI, Yong Jun. Extremophilic microorganisms for the treatment of toxic pollutants in the environment. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 4916, 2020.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, Irina et al. Surviving in the brine: a multi-omics approach for understanding the physiology of the halophile fungus *Aspergillus sydowii* at saturated NaCl concentration. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 840408, 2022.

JIMOH, Abdullahi Adekilekun; IKHIMIUKOR, Odion Osebhahiem; ADELEKE, Rasheed. Prospects in the bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants from hypersaline environments: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 24, p. 35615-35642, 2022.

JOHNSTON, Jill E.; LIM, Esther; ROH, Hannah. Impact of upstream oil extraction and environmental public health: A review of the evidence. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 187-199, 2019.

JUNIOR, Joberson Alves et al. Sequential degradation of raw vinasse by a laccase enzyme producing fungus *Pleurotus sajor-caju* and its ATPS purification. **Biotechnology reports**, v. 25, p. e00411, 2020.

KABIR, Md Fauzul; OVI, Afranul Qader; JU, Lu-Kwang. Real-time pH and temperature monitoring in solid-state fermentation reveals culture physiology and optimizes enzyme harvesting for tailored applications. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 188, 2025.

KERKAERT, Joshua D.; HUBERMAN, Lori B. Regulation of nutrient utilization in filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 107, n. 19, p. 5873-5898, 2023.

KHALIL, Doaa Montaser Ahmed et al. Bioremoval capacity of phenol by some selected endophytic fungi isolated from *Hibiscus sabdariffa* and batch biodegradation of phenol in paper and pulp effluents. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 407, 2021.

KHEMILI-TALBI, Souad et al. Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. **Extremophiles**, v. 19, p. 1109-1120, 2015.

KHLAIFAT, Abdelaziz et al. High-salinity produced water treatment and desalination. **LHB**, v. 109, n. 1, p. 2284957, 2023.

KIKANI, Bhavtosh et al. Solvent tolerant enzymes in extremophiles: adaptations and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 238, p. 124051, 2023.

KIM, Eunji et al. Monitoring microbial community structure and variations in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant. **Bioresource technology**, v. 306, p. 123178, 2020.

KONG, Helen; MAT, Hanapi; YUNUS, Mohd Azizi Che. Batch adsorptive removal of BTEX from aqueous solution: a review. In: **Third International Conference on Separation Technology 2020 (ICoST 2020)**. Atlantis Press, 2020. p. 303-318.

KOSSUGA, Miriam H. et al. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 257-267, 2012.

KUMAR, Adarsh; CHANDRA, Ram. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, 2020.

KUMAR, Ashutosh et al. Protein adaptations in extremophiles: an insight into extremophilic connection of mycobacterial proteome. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. London: Academic Press, 2018. p. 147-157.

KWOK, Richard K. et al. Developing large-scale research in response to an oil spill disaster: a case study. **Current environmental health reports**, v. 6, p. 174-187, 2019.

ŁAWNICZAK, Łukasz et al. Microbial degradation of hydrocarbons—basic principles for bioremediation: a review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 856, 2020.

LI, Haohao et al. Effects of soil-groundwater environmental factors on BTEX transport and transformation: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 5, p. 113697, 2024a.

LI, Shuangqi et al. Effects of Co-Exposure to Benzene, Toluene, and Xylene, Polymorphisms of microRNA Genes, and Their Interactions on Genetic Damage in Chinese Petrochemical Workers. **Toxics**, v. 12, n. 11, p. 821, 2024b.

LOI, Martina et al. Fungal laccases: The forefront of enzymes for sustainability. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1048, 2021.

LÜBECK, Mette; LÜBECK, Peter Stephensen. Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 753, 2022.

LUO, Ying et al. Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, p. 127-134, 2020.

MADIGAN, M. T. et al. *Brock Biology of Microorganisms*. Boston: Pearson, 2019.

MAGNUSON, Jon K.; LASURE, Linda L. Organic acid production by filamentous fungi. **Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine**, 2016.

MAINKA, Thomas et al. Potential applications of halophilic microorganisms for biological treatment of industrial process brines contaminated with aromatics. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 1-2, p. kuab015, 2021.

MAJEED, Bzhwen Khalid; SHWAN, Dler MS; RASHID, Khasraw A. A Review on Environmental Contamination of Petroleum Hydrocarbons; Its Effects and Remediation Approaches. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 2025.

MÄKELÄ, Miia R. et al. The fungus *Aspergillus niger* consumes sugars in a sequential manner that is not mediated by the carbon catabolite repressor CreA. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 6655, 2018.

MARCHEZI, Giovana et al. Optimizing Submerged Fermentation Conditions of *Aspergillus niger* for Chitin Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-15, 2025.

MARQUES, Catarina R. Extremophilic microfactories: applications in metal and radionuclide bioremediation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1191, 2018.

MAT JALIL, Mohd Taufiq et al. Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 45, 2023.

MATE, Diana M.; ALCALDE, Miguel. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457-1467, 2017.

MCGENITY, Terry J. et al. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. **Aquatic biosystems**, v. 8, p. 1-19, 2012.

MCNUTT, M. K. et al. Applications of science and engineering to quantify and control the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 50, p. 20222–20228, 2012.

MEKONNEN, Bassazin Ayalew; ARAGAW, Tadele Assefa; GENET, Melkamu Birilie. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements. **Frontiers in Environmental Science**, v. 12, p. 1354422, 2024.

MELLO, Flávia Elis de et al. Crescimento micelial radial e esporulação de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 4, p. 374-379, 2018.

MILAVEC, Justin et al. 1, 4-Dioxane cosolvency impacts on trichloroethene dissolution and sorption. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 777-783, 2019.

MINDUBAEV, A. Z. et al. *Aspergillus niger* AM1 strain as causative agent for oil and petroleum products biodegradation. **Mycology and Phytopathology**, v. 58, n. 1, p. 27-35, 2024.

MOKASHE, Narendra; CHAUDHARI, Bhushan; PATIL, Ulhas. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 493-522, 2018.

MORENO, Renata; ROJO, Fernando. The importance of understanding the regulation of bacterial metabolism. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 54, 2022.

NAVADA, Sharada et al. Biofilms remember: osmotic stress priming as a microbial management strategy for improving salinity acclimation in nitrifying biofilms. **Water Research**, v. 176, p. 115732, 2020.

NAVADA, Sharada; VADSTEIN, Olav. Salinity acclimation strategies in nitrifying bioreactors. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, p. 867592, 2022.

NEFF, J. M. *Bioaccumulation in marine organisms: effect of contaminants from oil well produced water*. Oxford: Elsevier, 2002.

NESCI, A.; ETCHEVERRY, M.; MAGAN, N. Osmotic and matrix potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 965-972, 2004.

NIVEDITA et al. A high-throughput RNA-Seq approach to elucidate the transcriptional response of *Piriformospora indica* to high salt stress. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4129, 2021.

OBUEKWE, Christian O. et al. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 56, n. 4, p. 197-205, 2005.

OLIVEIRA, J. A. *Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)*. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OREN, Aharon et al. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. **Biodegradation**, v. 3, p. 387-398, 1992.

OREN, Aharon. Novel insights into the diversity of halophilic microorganisms and their functioning in hypersaline ecosystems. **npj Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 18, 2024.

PACHAIAPPAN, Rekha et al. A review on biofiltration techniques: recent advancements in the removal of volatile organic compounds and heavy metals in the treatment of polluted water. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 8432-8477, 2022.

PAPAGIANNI, Maria. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007.

PASSANTE, Elexius K. et al. Halophilic bacteria in a Lake Michigan drainage basin as potential biological indicators of chloride-impacted freshwaters. **Science of the Total Environment**, v. 846, p. 157458, 2022.

PAULO, Ana MS et al. Unravelling microbiome changes in aerobic granular sludge saline wastewater treatment using a slow stepwise salt increase strategy. **Environmental Science: Advances**, v. 3, n. 12, p. 1788-1801, 2024.

PERDANA, Analekta Tiara; ARIANATA, Mutia; LARASATI, Tri Retno Dyah. Optimization of Benzene and Toluene Biodegradation by *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi**, v. 5, n. 2, p. 87-91, 2019.

PÉREZ-LLANO, Yordanis et al. Stress reshapes the physiological response of halophile fungi to salinity. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 525, 2020.

PISCITELLI, Alessandra et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current genomics**, v. 12, n. 2, p. 104-112, 2011.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. 3. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2009.

PÓCSI, István et al. Biotechnological potential of salt tolerant and xerophilic species of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 521, 2024.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology*. 10. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2020.

PRINCE, R. C. Global consequences of ubiquitous hydrocarbon utilizers. In: McGENITY, T. J.; AMANDE, T. J.; PRINCE, R. C. (ed.). *Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes*. Cham: Springer, 2019. p. 319–335.

PRINCE, Roger C.; AMANDE, Tivkaa J.; MCGENITY, Terry J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. **Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes**, p. 1-39, 2019.

PRIYANKA, Uddandaraao; LENS, Piet NL. Enhanced removal of hydrocarbons BTX by light-driven *Aspergillus niger* ZnS nanobiohybrids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 157, p. 110020, 2022.

RABUS, Ralf; WILKES, Heinz. Functional genomics of anaerobic degradation of hydrocarbons: an introduction. In: *Anaerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*. [S. l.]: Springer Nature, 2020. p. 199-202.

RAJBONGSHI, Amarjit; GOGOI, Subrata Borgohain. A review on oilfield produced water and its treatment technologies. **Petroleum Research**, v. 9, n. 4, p. 640-656, 2024.

RAMA, Fabrizio et al. Flow field dynamics and high ethanol content in gasohol blends enhance BTEX migration and biodegradation in groundwater. **Journal of contaminant hydrology**, v. 222, p. 17-30, 2019.

RAVAL, V. H.; BHATT, H. B.; SINGH, S. P. Adaptation strategies in halophilic bacteria. In: DAS, S. (ed.). *Extremophiles: sustainable resources and biotechnological implications*. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 137–164.

REED, Christopher J. et al. Protein adaptations in archaeal extremophiles. **Archaea**, v. 2013, n. 1, p. 373275, 2013.

REZAEI, Zeinab; AMOOZEGAR, Mohammad Ali; MOGHIMI, Hamid. Innovative approaches in bioremediation: the role of halophilic microorganisms in mitigating hydrocarbons, toxic metals, and microplastics in hypersaline environments. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 184, 2025.

RODRIGUES, Kelly et al. Decolorization and detoxification of industrial wastewater containing indigo carmine by *Aspergillus niger* AN400 in sequential reactors. **Colorants**, v. 3, n. 1, p. 73-85, 2024a.

RODRIGUES, Kelly et al. Detoxification of BTEX in a saline environment by *Aspergillus niger*. 2024b.

RODRIGUES, Kelly et al. Thriving in salty environments: *Aspergillus niger*'s halotolerance and BTEX biodegradation potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 6, 2025.

SANTOS, J. P. et al. Investigação da contaminação por hidrocarbonetos aromáticos em águas subterrâneas de Natal, RN. *Revista de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, v. 7, n. 2, p. 58-73, 2018.

SANTURTÚN, Ana et al. Are BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes) involved in the development of amyotrophic lateral sclerosis?. **Air Quality, Atmosphere & Health**, v. 17, n. 12, p. 2899-2908, 2024.

SAROSH, Saquib; RAMASWAMI, Sreenivasan. The salinity tipping point: determining the impact of stepwise increase in salinity on nitrification and biofilm community structure in nitrifying packed bed biofilm reactors. **Bioresource Technology**, p. 133089, 2025.

SATHESH-PRABU, Chandran et al. Comparative genomic analysis and BTEX degradation pathways of a thermotolerant *Cupriavidus cauae* PHS1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 875, 2023.

SCHNEIDER, Marcio Roberto et al. Long-term evaluation of hydrocarbon degradation rates within the source zone under natural and enhanced attenuation for site closure purposes. **Remediation Journal**, v. 34, n. 3, p. e21778, 2024.

SHARMA, Neha; GUPTA, Vikas C. Batch biodegradation of phenol of paper and pulp effluent by *Aspergillus niger*. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 3, n. 3, p. 182, 2012.

SHEKARI, Reyhaneh; MOHAMMADI, Parisa; ZARRINI, Gholamreza. Isolation and characterization of native fungal strains for the bioremediation of BTEX pollutants. **Fungal Biology**, v. 129, n. 1, p. 101534, 2025.

SILAS, Manasseh et al. Toxicity and phytochemical analysis of petroleum-ether, ethanolic and aqueous extracts of *Ceratotheca sesamoides*. 2020.

SILVA MONTEIRO, João Paulo et al. Exploring Novel Fungal–Bacterial Consortia for Enhanced Petroleum Hydrocarbon Degradation. **Toxics**, v. 12, n. 12, p. 913, 2024.

SILVA, C. F. et al. Níveis de BTEX em águas subterrâneas próximas a postos de combustíveis em Santa Catarina. *Química Nova*, v. 42, n. 5, p. 634-641, 2019.

SILVA, P. F.; LACERDA, C. A.; MARQUES, A. L. B.; MARQUES, E. P. Avaliação do teor de BTX em gasolinas comerciais no estado do Maranhão. In: *58º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA*, 2018. Anais... [S.l.: s.n.], 2018. ISBN 978-85-85905-23-1.

ŠIMONOVÍČOVÁ, Alexandra et al. *Aspergillus niger* environmental isolates and their specific diversity through metabolite profiling. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 658010, 2021.

SOMEE, Maryam Rezaei et al. Halophiles in bioremediation of petroleum contaminants: challenges and prospects. **Bioremediation for environmental sustainability**, p. 251-291, 2021.

SRAVAN, J. Shanthi; MATSAKAS, Leonidas; SARKAR, Omprakash. Advances in biological wastewater treatment processes: focus on low-carbon energy and resource recovery in biorefinery context. **Bioengineering**, v. 11, n. 3, p. 281, 2024.

STATISTA. Global oil consumption in metric tons 2023. 2024. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/265261/global-oil-consumption-in-million-metric-tons/>. Acesso em: 14 maio 2025.

TEBBOUCHE, Latifa et al. Evaluation of the phenol biodegradation by *Aspergillus niger*: application of full factorial design methodology. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 13, p. 6124-6130, 2016.

THEGARATHAH, Paveethra et al. *Aspergillus niger* as an efficient biological agent for separator sludge remediation: two-level factorial design for optimal fermentation. **PeerJ**, v. 12, p. e17151, 2024.

UFOT, Ekemini A. et al. Enzymatic activities of halotolerant and halophilic fungi isolated from Iko River Estuary, South-South Nigeria. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 12-27, 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). National Contingency Plan Product Schedule. Mar. 2015. Disponível em: <https://www.epa.gov/>. Acesso em: 5 mar. 2025.

UNITED STATES. Department of Energy (DOE). *Produced water from oil and gas development and critical minerals fact sheet*. Washington, D.C.: U.S. DOE, 2024. Disponível em: <https://www.energy.gov> Acesso em: 24 set. 2025.

UNITED STATES. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. *International Energy Outlook 2019: with projections to 2050*. Washington, DC: U.S. Department of Energy, Office of Energy Analysis, 2019. Disponível em: <https://www.eia.gov/ieo> . Acesso em: 5 mar. 2025.

US EPA. Method 5021A: Volatile Organic Compounds in Soils and Other Solid Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis. Washington, DC, 2014.

US EPA. Method 8260D: Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Washington, DC, 2018.

USMAN, N.; ATTA, H. I.; TIJJANI, M. B. Biodegradation studies of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) compounds by *Gliocladium* sp. and *Aspergillus terreus*. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 24, n. 6, p. 1063-1069, 2020.

VAKSMAA, Annika et al. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, p. 1070905, 2023.

VAN DER OOST, Ron; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico PE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN WAMBEKE, France et al. Factors limiting heterotrophic bacterial production in the southern Pacific Ocean. **Biogeosciences**, v. 5, n. 3, p. 833-845, 2008.

VARRIALE, Ludovica; ULBER, Roland. Fungal-Based Biorefinery: From Renewable Resources to Organic Acids. **ChemBioEng Reviews**, v. 10, n. 3, p. 272-292, 2023.

VIEIRA, D. S.; CAMMARTOTA, M. C.; CAMPORESE, E. F. S. Redução de contaminantes presentes na água de produção de petróleo. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS, 2003. *Anais...* [S.l.: s.n.], 2003. p. 6.

VISWANATH, Buddolla et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme research**, v. 2014, n. 1, p. 163242, 2014.

VISWANATH, Buddolla et al. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, 2008.

WANG, Hai et al. A comparison of the performance of bacterial biofilters and fungal–bacterial coupled biofilters in BTEp-X removal. **PeerJ**, v. 12, p. e17452, 2024.

WANG, Jinxiu et al. Research progress regarding the role of halophilic and halotolerant microorganisms in the eco-environmental sustainability and conservation. **Journal of Cleaner Production**, v. 418, p. 138054, 2023.

WANG, Qian; BIAN, Jianmin; RUAN, Dongmei. Volatilization of benzene on soil surface under different factors: evaluation and modeling. **Sustainable Environment Research**, v. 34, n. 1, p. 18, 2024.

WU, Meng-Hsuan et al. Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 9754, 2019.

WU, Yingzi et al. Optimization of the fermentation process for fructosyltransferase production by *Aspergillus niger* FS054. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 173, 2025.

XIN, Qin et al. Fate, behaviour and microbial response of diluted bitumen and conventional crude spills in a simulated warm freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 343, p. 123224, 2024.

YOO, Yeonjae et al. Insights into saline adaptation strategies through a novel halophilic bacterium isolated from solar saltern of Yellow sea. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, p. 1229444, 2023.

ZAFRA, German; ABSALÓN, Angel E.; CORTÉS-ESPINOSA, Diana V. Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 937-941, 2015.

ZAJC, Janja et al. The mycobiota of the salterns. In: *Biology of marine fungi*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 133-158.

ZAKARIA, Latiffah. An overview of *Aspergillus* species associated with plant diseases. **Pathogens**, v. 13, n. 9, p. 813, 2024.

ZHAN, Pengfei et al. Plant litter decomposition in wetlands is closely associated with phyllospheric fungi as revealed by microbial community dynamics and co-occurrence network. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 142194, 2021.

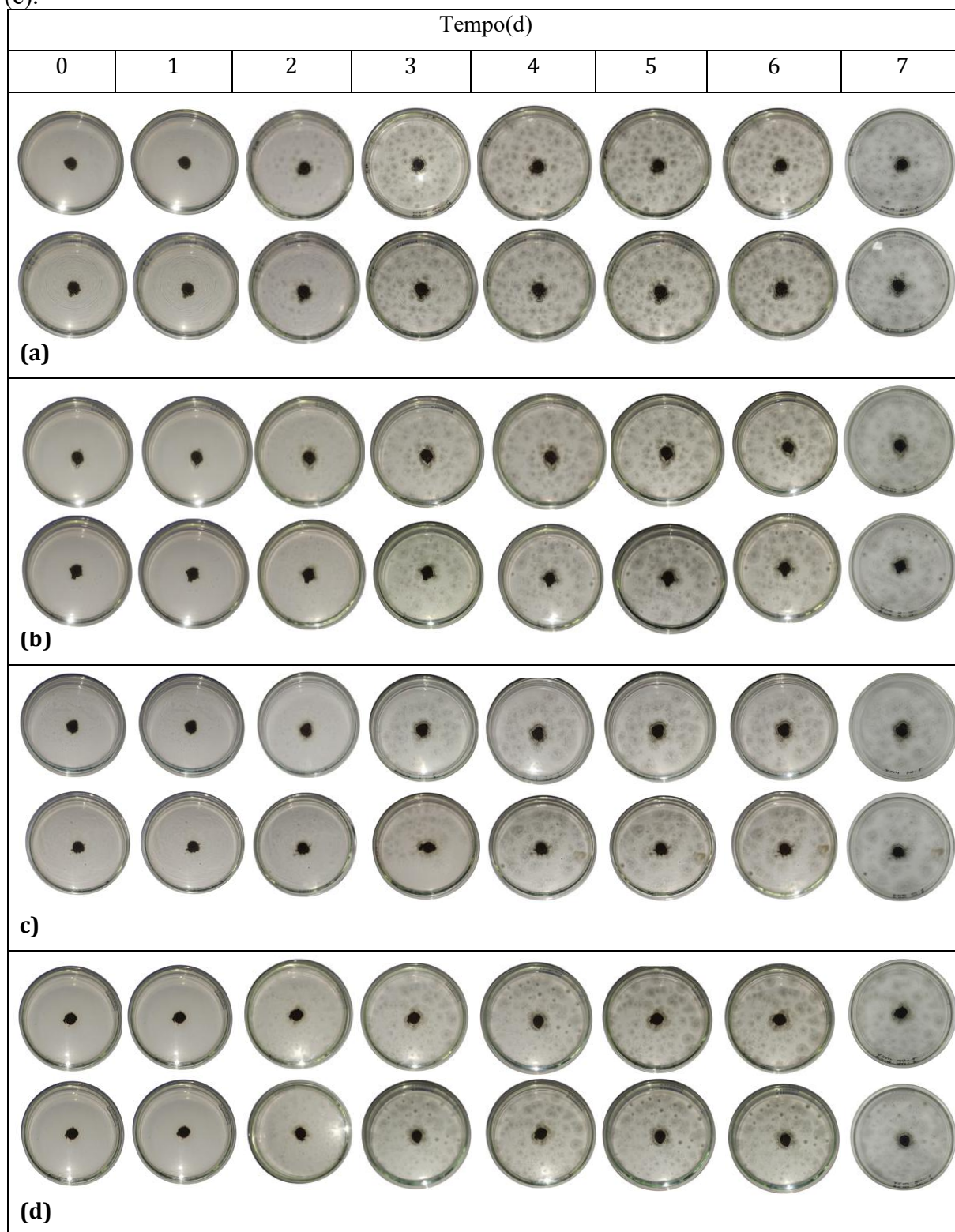
ZHANG, Junhui; FENG, Wendi; REN, Lu. Fungal Extracellular Enzymes from *Aspergillus* spp. as Promising Candidates for Extra-Heavy Oil Degradation and Enhanced Oil Recovery. **Microorganisms**, v. 12, n. 11, p. 2248, 2024.

ZHANG, Long-Bin et al. A complex metabolic network and its biomarkers regulate laccase production in white-rot fungus *Cerrena unicolor* 87613. **Microbial cell factories**, v. 23, n. 1, p. 167, 2024.

ZHUANG, Xuliang et al. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1119-1126, 2010.

APÊNDICE

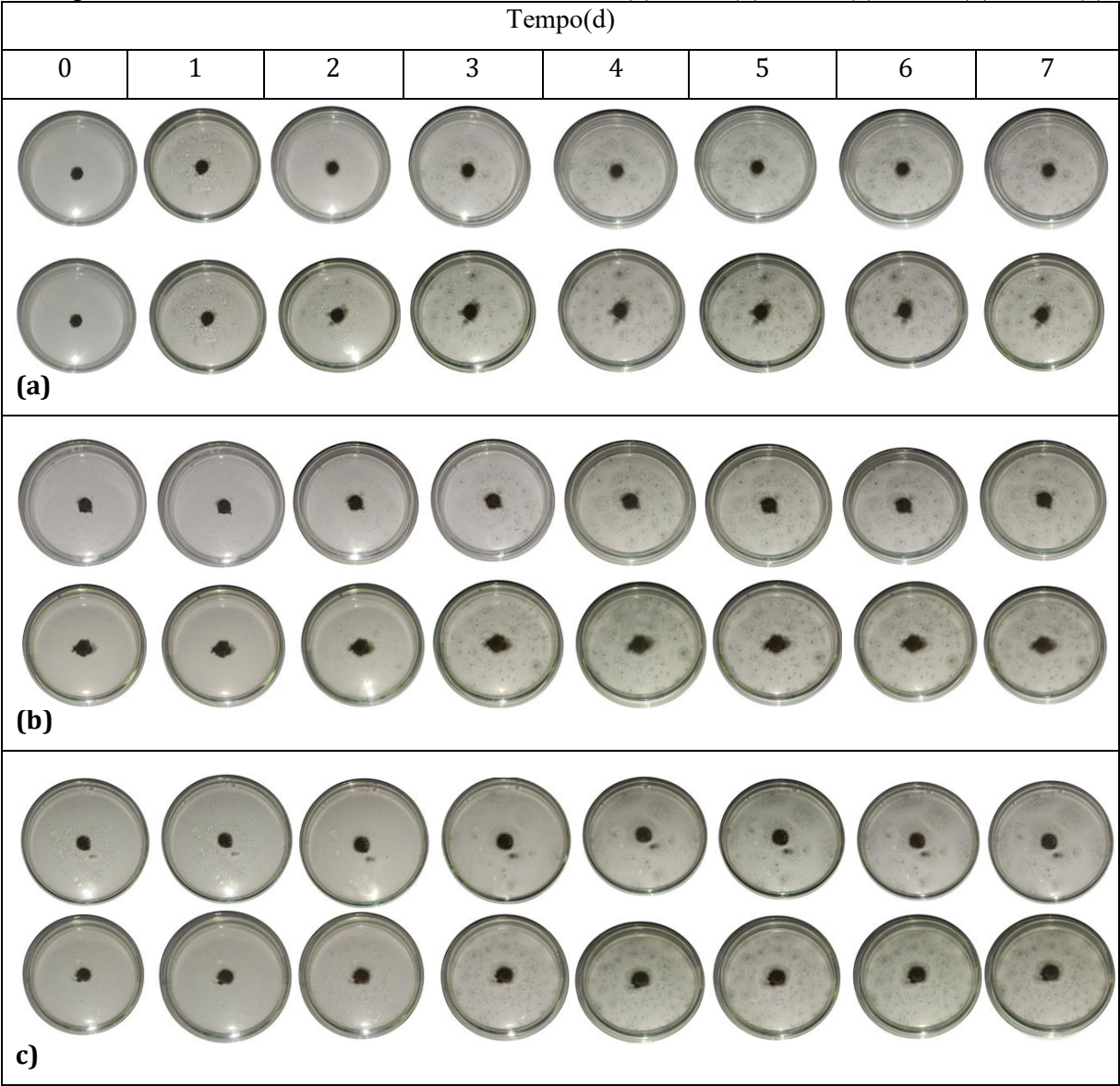
Figura A1 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio ASW CAG 0,5 – Controle (a), 5‰ (b), 10‰ (c), 20‰ (d), 30‰ (e).

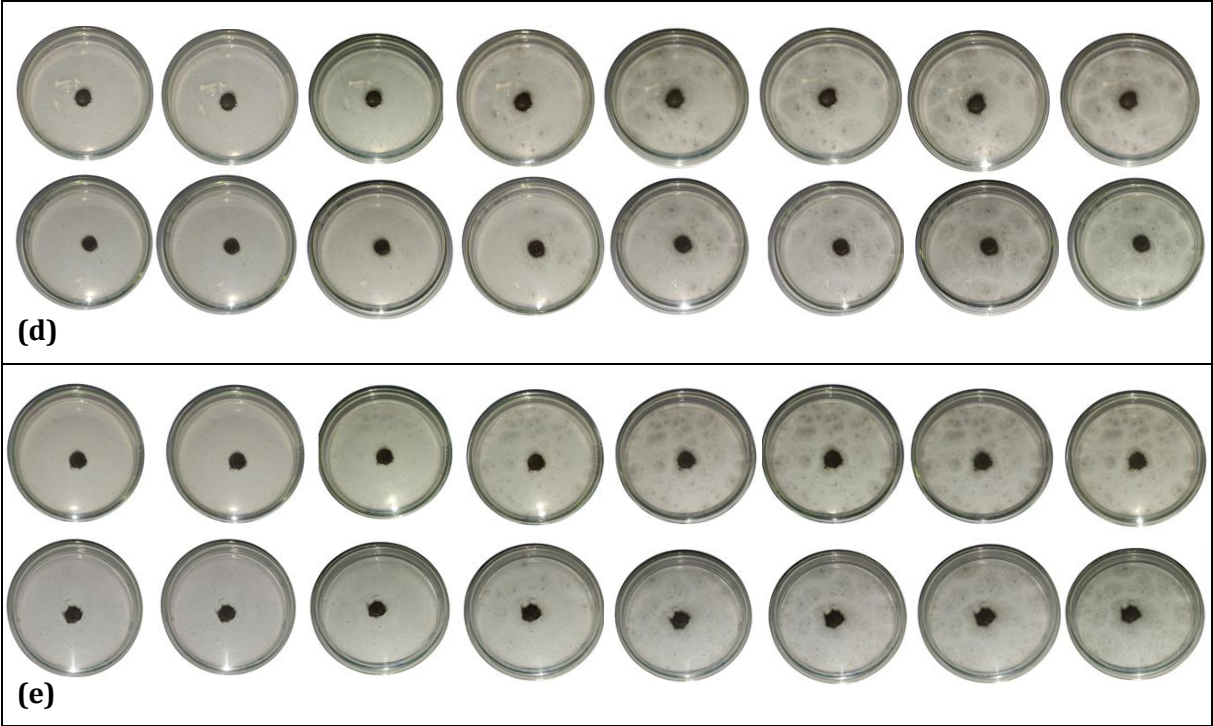




Fonte: Autora (2025).

Figura A2 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio ASW CAG 5 – Controle (a), 5 ‰ (b), 10‰ (c), 20‰ (d), 30‰ (e).

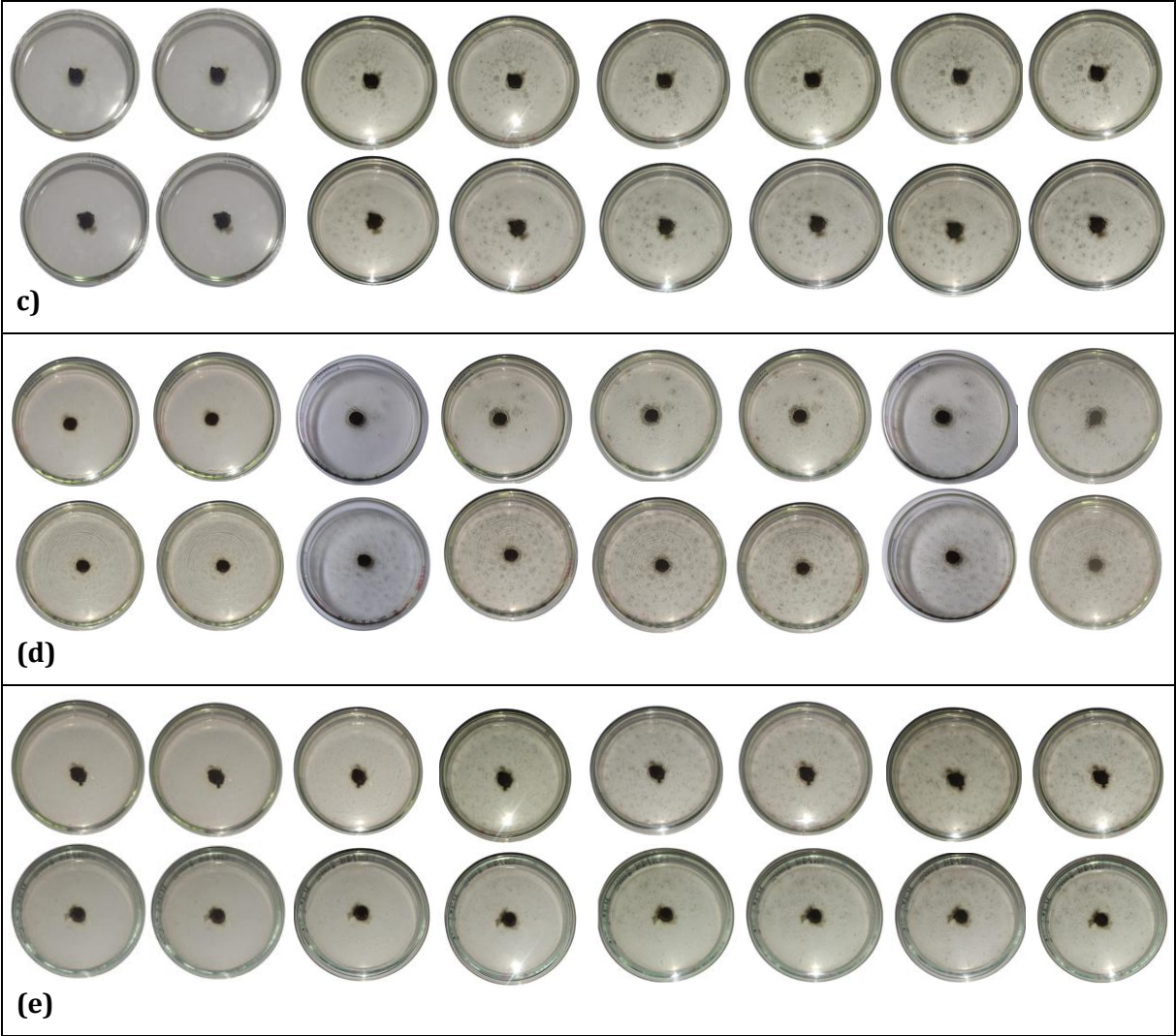




Fonte: Autora (2025).

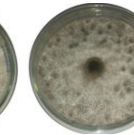
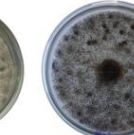
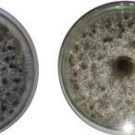
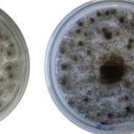
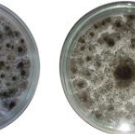
Figura A3 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio ASW ELG 0,5 – Controle (a), 5 ‰ (b), 10‰ (c), 20‰ (d), 30‰ (e).

Tempo(d)								
	0	1	2	3	4	5	6	7
(a)	-							
	-							
(b)	-							
	-							

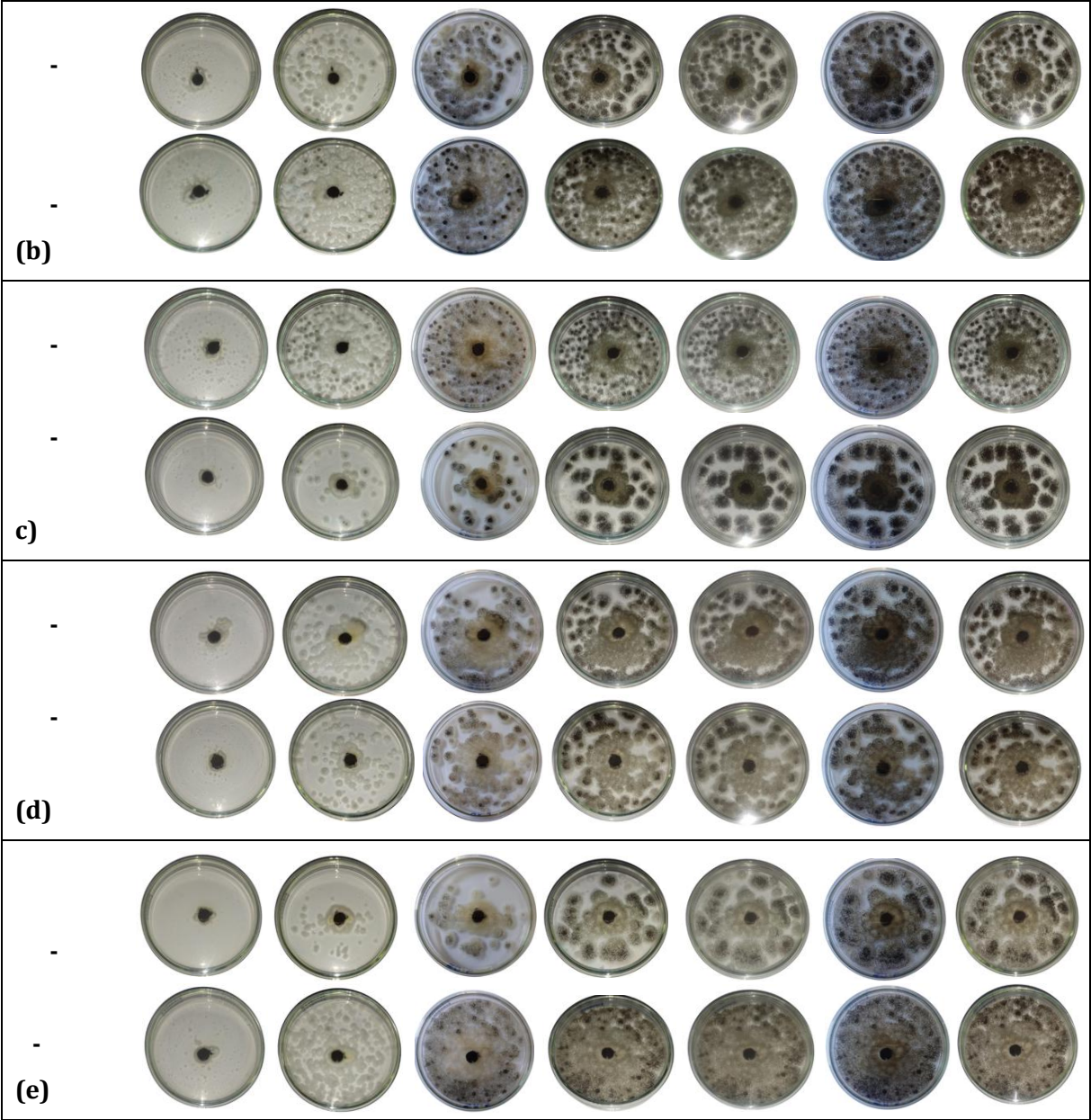


Fonte: Autora (2025).

Figura A5 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio Czapec salino – Controle (a), 5 ‰ (b), 10‰ (c), 20‰ (d), 30‰ (e).

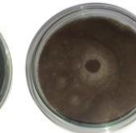
Tempo(d)								
	0	1	2	3	4	5	6	7
-								
-								

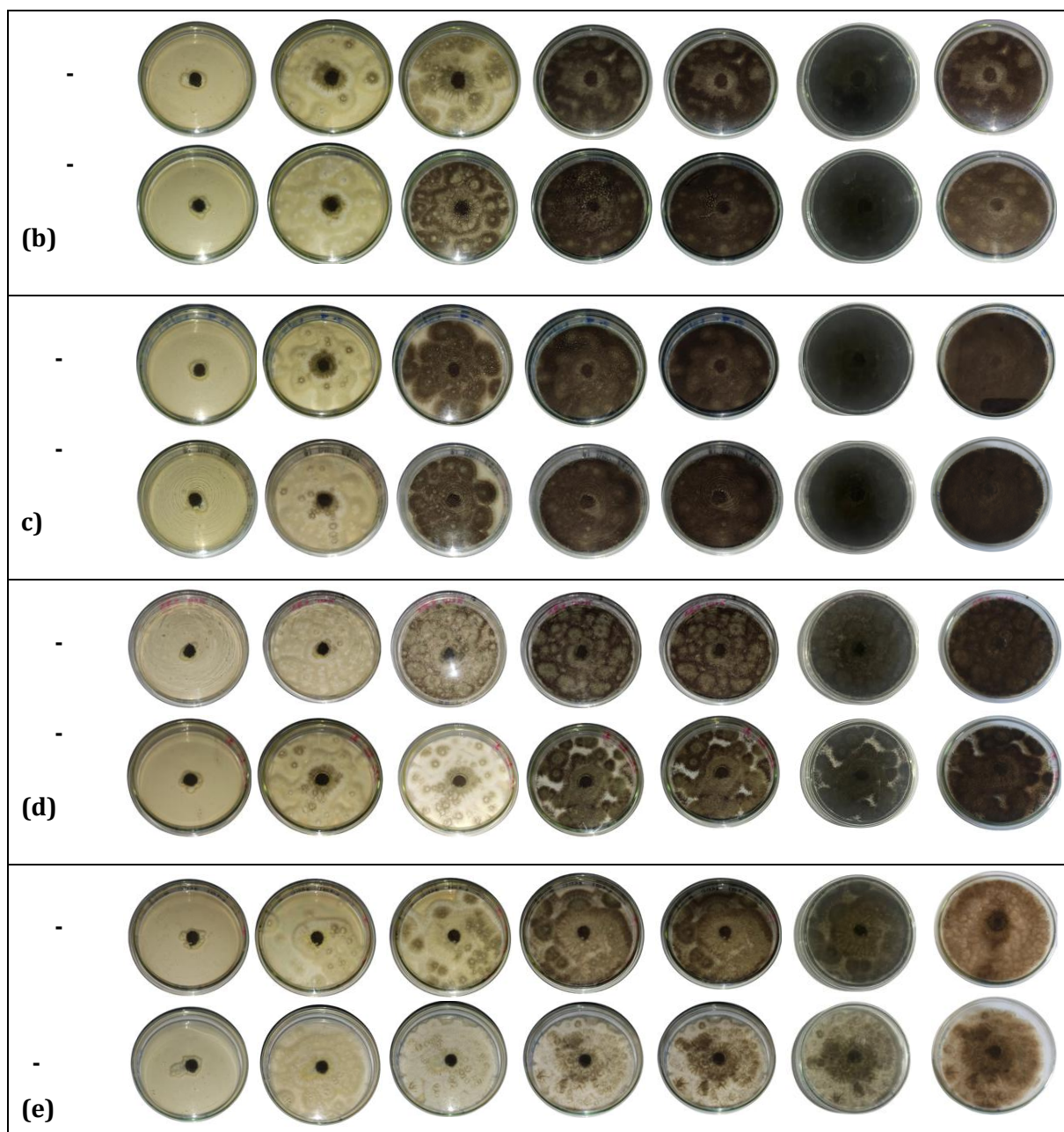
(a)



Fonte: Autora (2025).

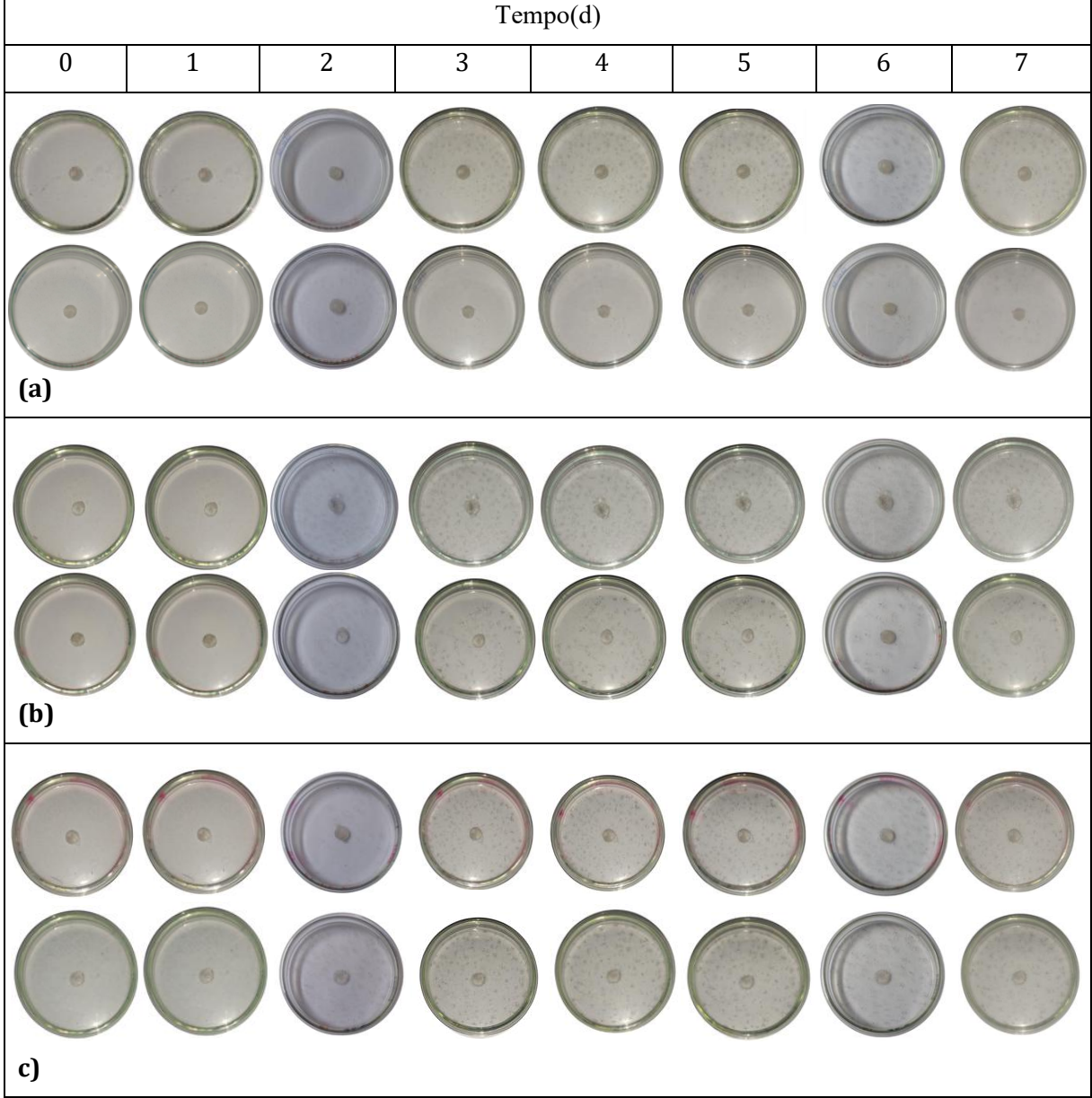
Figura A6 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio *Sabouraud* salino –Controle (a), 5‰ (b), 10‰ (c), 20‰ (d), 30‰ (e).

Tempo(d)								
	0	1	2	3	4	5	6	7
(a)	-							
	-							



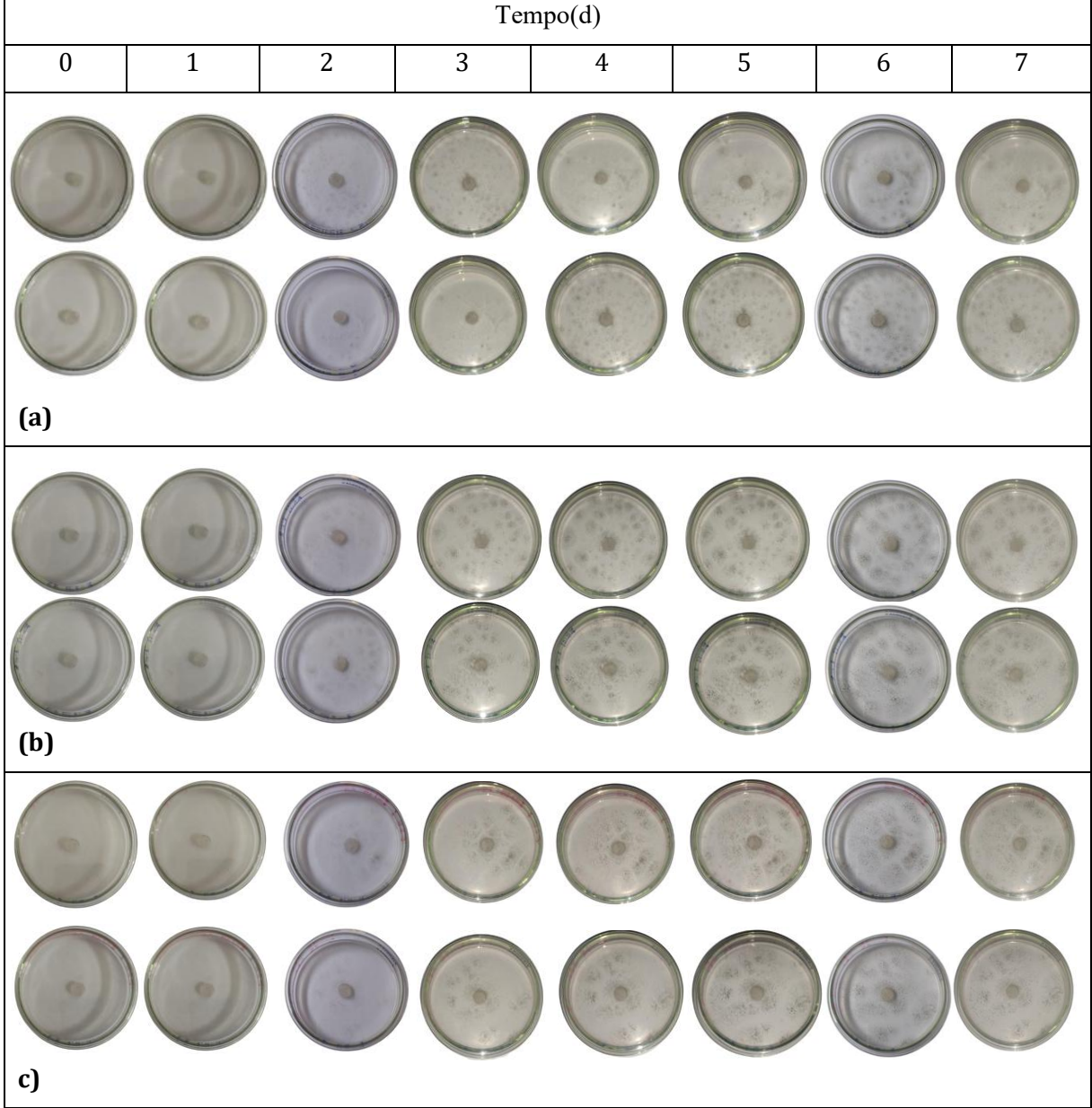
Fonte: Autora (2025).

Figura A7 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio ASW ELG 0,5 sem BTEX – Controle (a), exposto a BTEX - 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b), 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c).



Fonte: Autora (2025).

Figura A8 — Crescimento de placas controle de crescimento isolado das colônias de *A. niger* ao longo de 7 dias no meio ASW CAG 0,5 sem BTEX – Controle (a), exposto a BTEX - 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b), 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c).



Fonte: Autora (2025).