

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**APLICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA REMEDIAÇÃO DE ÁGUAS
MARINHAS CONTAMINADAS COM HIDROCARBONETOS**

Amanda Pasinato Napp

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Setembro de 2014.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para seu desenvolvimento, este trabalho também contou com apoio e fomento da empresa Bioplus Biotecnologia Aplicada Ltda.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Marilene Henning Vainstein, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por todo apoio, ensinamentos, confiança e paciência a mim depositados e, além disso, por acreditar na minha capacidade ao longo do projeto desenvolvido;

À empresa Bioplus Biotecnologia Aplicada Ltda, em especial ao Dr. Sydney Mitidieri, por me acolherem em seu quadro de profissionais, e por todo apoio, incentivo e fomento depositado nesse projeto de pesquisa;

À colega e amiga, Msc. Sara R. Allebrandt, que sempre se mostrou preocupada e interessada, a qual foi essencial para meu ingresso no mestrado, uma pessoa que admiro pela força de vontade e determinação, um verdadeiro exemplo para mim;

Ao professor Augusto Schrank que, me recebeu em seu qualificado grupo, o que foi muito importante para meu crescimento pessoal e profissional;

Aos professores Charley C. Staats e Lívia Kmetzsch os quais, sempre se mostraram dispostos em ensinar e solucionar problemas e dúvidas no decorrer do trabalho em laboratório;

Aos professores, Alexandre Macedo e Fátima M. Bento, membros da comissão de acompanhamento;

Às alunas de iniciação científica, Caroline Salvati e Daniela Goetze, sem as quais esta pesquisa não teria iniciado;

Aos alunos de iniciação científica Solon Andrade da Rosa e Jackson Feltraco pelo auxílio e comprometimento durante o transcorrer desse trabalho;

À aluna Francielle Bucker do Laboratório de Biorremediação da Faculdade de Agronomia, por toda colaboração neste trabalho;

Aos amigos e colegas dos laboratórios 220 e 217, pela convivência diária e amizade, e que de alguma maneira contribuíram e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho;

Ao pessoal da secretaria do PPGBCM, principalmente Luciano e Silvia, pela disponibilidade e auxílio no decorrer do mestrado;

Aos meus pais, que me deram todo o apoio necessário ao longo de toda a minha vida, me ensinando sempre a buscar mais e sempre acreditando nas minhas escolhas, sem os quais nenhuma das minhas conquistas seria possível;

Às minhas amigas e colegas desde a faculdade, Mariana Migliorini Parisi e Cassiana Siebert, que sempre estiveram presentes me ajudando a encarar as mudanças da minha vida pessoal e profissional, e que me ensinaram o verdadeiro significado de amizade e companheirismo;

Aos grandes amigos que o mestrado me deu, em especial ao Rafael, Eder, Francine, Letícia, Ângela, Rana, Nicolau e Rodolfo, pela amizade, companheirismo e parceria sempre, características que fortalecem nossa amizade, pessoas que se tornaram muito importantes para mim;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de realização do ensino superior de qualidade;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS	13
INTRODUÇÃO GERAL	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Origem e composição do petróleo	18
1.2. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo	23
1.3. Acidentes ambientais e Legislações Vigentes	25
1.4. Técnicas de remediação.....	31
1.4.1. Biorremediação	32
1.5. Produção de biossurfactantes	37
1.6. Degradação dos hidrocarbonetos do petróleo e micro-organismos utilizados.....	40
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. Obtenção da Amostra.....	49
3.2. Isolamento dos micro-organismos.....	49
3.3. Avaliação preliminar da biodegradação de hidrocarbonetos	50
3.3.1. Utilização do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio.....	50
3.3.2. Teste prévio em placa para seleção de linhagens degradadoras de petróleo	51
3.4. Ensaio de biorremediação.....	52
3.5. Avaliação da produção de biossurfactantes	53
3.5.1. Teste de CTAB	53
3.5.2. Índice de emulsificação	54
3.5.3. Tensão superficial	54
3.6. Determinação de pH.....	55
3.7. Viabilidade celular.....	55

3.8. Identificação molecular	56
3.8.1. Extração do DNA genômico das bactérias	56
3.8.2. Extração do DNA genômico das leveduras	57
3.8.3. Amplificação de DNA ribossomal	58
3.8.4. Sequenciamento de DNA	59
3.8.5. Alinhamento das sequências nucleotídicas	60
3.9. Seleção do consórcio microbiano	60
3.10. Análise cromatográfica	60
3.11. Análise estatística	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Isolamento dos micro-organismos	62
4.2. Seleção preliminar de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos	65
4.2.1. Indicador redox TTC	65
4.2.2. Avaliação preliminar visual da degradação de hidrocarbonetos	69
4.3. Avaliação da produção de biossurfactantes	72
4.3.1. Produção de ramnolipídeos pelos micro-organismos	72
4.3.2. Determinação do índice de emulsificação	76
4.3.3. Medida da tensão superficial (TS)	82
4.4. Determinação de pH	90
4.5. Análise da recuperação celular	94
4.6. Identificação molecular dos micro-organismos selecionados	95
4.7. Avaliação da capacidade degradativa de hidrocarbonetos realizada pelo consórcio microbiano	97
5. CONCLUSÕES	101
6. PERSPECTIVAS	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
8. APÊNDICES	124

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AH1	Alcano-hidroxilases 1
AH2	Alcano-hidroxilases 2
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
API	Instituto Americano do Petróleo
BDA	Agar Batata Dextrose
BPH	Coleção de micro-organismos para remediação de hidrocarbonetos da Bioplus
C1,2O	1,2-Catecol Dioxigenases
C2,3O	2,3- Catecol Dioxigenases
C5	Isopreno
C10	Pristano
C20	Fitano
CMC	Concentração Micelar Crítica
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	Estudo Prévio de Impacto Ambiental
EMBL	Laboratório de Biologia Molecular Europeu
g	Gramas

CG-FID	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas
h	Horas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IE	Índice de Emulsificação
ITOPF	Federação Internacional de Poluição de Proprietários de Petroleiros
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LB	Luria-Bertani
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MM1	Meio Mineral 1
MMA	Ministério do Meio Ambiente
mN/m	miliNewton por metro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
ng	Nanograma
P3,4O	3,4-Protocatecol Dioxigenase
PAE	Plano de Ação de Emergência
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEI	Plano de Emergência Individual
pH	Potencial de hidrogênio iônico
pmol	Picomol
rDNA	DNA ribossômico
REFAP	Refinaria Alberto Pasqualini

RIMA	Relatório de Impacto Ambiental
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
TPF	Trifenil-formazan
TPH	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo
TPHCWG	<i>Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group</i>
TPH-DRO	TPH na faixa do Diesel
TPH-GRO	TPH na faixa da Gasolina
TPH-ORO	TPH na faixa do Óleo lubrificante
TS	Tensão Superficial
UCM	Mistura complexa não resolvida
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Evolução da matéria orgânica durante os processos de formação do petróleo. Fonte: adaptado de Peters e Moldowan, 1993..... 19
- Figura 2:** Compostos orgânicos representativos encontrados em óleo cru. Fonte: adaptado de Zhu *et al.*, 2001..... 21
- Figura 3:** Mecanismo de solubilização de hidrocarbonetos dentro de micelas de surfactantes. (A) a concentração de hidrocarbonetos aumenta e o espaço disponível diminui, surfactantes tendem a se organizar e agregar. (B) Ponto chamado de “concentração micelar crítica” (CMC) no qual as micelas são formadas capturando os hidrocarbonetos para seu centro hidrofóbico. (C) Hidrocarbonetos dispersos, tornando-se mais disponíveis para assimilação. Fonte: Perfumo *et al.*, 2010..... 37
- Figura 4:** Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do contaminante com a concentração de surfactante. Fonte: adaptado de Mulligan *et al.*, 2001. 38
- Figura 5:** Processos de intemperização que ocorrem após um derramamento de petróleo. Fonte: adaptado de Zhu *et al.*, 2001. 41
- Figura 6:** Biodegradação aeróbia dos alcanos: (A) Oxidação terminal conduz à formação de ácidos graxos pela rota β -oxidação. (B) Uma alcano-hidroxilase pode atuar por processo de oxidação biterminal, transformando intermediários em ácidos dicarboxílicos. (C) Oxidação subterminal que gera um álcool secundário. Fonte: Vasconcelos, 2006..... 44

Figura 7: Biodegradação aeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos. (A) Clivagem na posição *orto* entre dois grupos hidroxila, pela ação das intradiol dioxigenases. (B) Clivagem na posição *meta* entre o átomo de carbono e a hidroxila, pela ação das extradiol dioxigenases. Fonte: adaptado de Dagley, 1986..... 45

Figura 8: Degradação de hidrocarbonetos aromáticos por micro-organismos: (A) Hidroxilação de Dioxigenases (enzimas periféricas); Clivagem de intermediários centrais por diferentes dioxigenases (enzimas de fissão): (B) Clivagem na porção *meta* por extradióis; (C) Clivagem na posição *orto* por intradióis. Fonte: Bertini *et al.*, 1995..... 46

Figura 9: Isolamento dos micro-organismos cultivados em meio (A) LB e (B) BDA. 62

Figura 10: Micro-organismos positivos para indicador redox TTC. (A) bactérias, (B) leveduras. C N = controle negativo (sem adição de células microbianas). 67

Figura 11: Teste prévio para análise do potencial degradador de petróleo dos micro-organismos selecionados, mostrando que os isolados (A) BPH 1.14, (B) BPH 1.4, (C) BPH1.5, (D) BPH 2.1, (E) BPH 2.2 e (F) BPH 2.3 são capazes de modificar meio contendo 2% de petróleo. (G) Controle Negativo: sem adição de células microbianas. 1. Água destilada; 2. Água marinha; 3. Água marinha com nutrientes; 4. Água destilada com nutrientes; 5. Meio mínimo; 6. Meio mínimo salino. 70

Figura 12: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados em meio de cultivo rico em nutrientes, contendo células. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para as triplicatas. ^ap<0,001 quando comparado ao C N; ^bp<0,01 quando comparado ao C N e ^cp<0,05 quando comparada a BPH 1.14 (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey). C N = controle negativo. 77

Figura 13: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados em meio de cultivo rico em nutrientes, na ausência de células. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para as triplicatas. ^a $p < 0,001$ quando comparado ao C N; ^b $p < 0,01$ quando comparado ao C N e ^c $p < 0,05$ quando comparada a BPH1.14 (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey). C N = controle negativo. 78

Figura 14: Aspectos da emulsificação da fase oleosa dos seis isolados testados, a partir de bioemulsificantes extracelulares. (A) bactérias, (B) leveduras. C N = controle negativo... 80

Figura 15: Quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo em tratamento de bioaugmentação com consórcio microbiano em meio contendo água marinha contaminada com 2% de petróleo. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura, estrutura química e efeitos tóxicos dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários.	23
Tabela 2: Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH).	24
Tabela 3: Meios de cultura para a inoculação dos micro-organismos.....	51
Tabela 4: Micro-organismos isolados de meio contaminado com petróleo.	63
Tabela 5: Micro-organismos selecionados como potenciais degradadores de petróleo.....	66
Tabela 6: Micro-organismos capazes de produzir ramnolipídeos.....	73
Tabela 7: Medida de tensão superficial (mN/m) dos isolados nos diferentes tratamentos em água destilada.....	82
Tabela 8: Medida de tensão superficial (mN/m) dos isolados nos diferentes tratamentos em água marinha.....	86
Tabela 9: Avaliação de pH da fase aquosa dos micro-organismos nos diferentes tratamentos em água destilada.....	90
Tabela 10: Avaliação de pH da fase aquosa dos micro-organismos nos diferentes tratamentos em água marinha.....	92
Tabela 11: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias após 14 dias de tratamento.	94
Tabela 12: Identificação molecular dos micro-organismos selecionados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos.	96

RESUMO

O petróleo é um composto orgânico formado basicamente por uma mistura de hidrocarbonetos sendo considerado uma das maiores fontes de energia da atualidade. A crescente demanda por derivados de petróleo tem aumentado a sua exploração. Como consequência, o número de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados na natureza tem se elevado, ocasionando sérios problemas ambientais. Desta forma, uma alternativa de mitigar os impactos ambientais resultantes dos vazamentos é por técnicas de biorremediação. Estas técnicas se baseiam na utilização de micro-organismos com potencial de biodegradar compostos, sendo práticas ambientalmente corretas e sustentáveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar micro-organismos capazes de se desenvolverem em ambientes aquáticos contendo petróleo, bem como caracterizar seu potencial de degradação deste contaminante. Para isso, 19 micro-organismos foram isolados a partir de solo previamente contaminado com petróleo bruto. Para avaliar a capacidade de biodegradação de petróleo ocasionada por cada isolado, estes foram submetidos a um teste prévio com indicador redox TTC, e três bactérias (BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 1.14) e três leveduras (BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3) foram selecionadas para testes futuros. Também foi realizada uma avaliação visual da solubilização dos hidrocarbonetos pelos micro-organismos selecionados em meios com tratamentos de bioaugmentação e bioaugmentação simultânea a bioestimulação. Visto que os seis micro-organismos se mostraram potenciais degradadores nestas primeiras etapas, os mesmos foram avaliados quanto a produção de biossurfactantes e foi determinada $IE_{24h}\% > 38$ e $IE_{24h}\% > 39$, na presença e ausência de células microbianas, respectivamente. Os isolados também foram capazes de reduzir a tensão superficial nos meios utilizados. BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 2.2 também produziram biossurfactantes do tipo ramnolipídeos. Adicionalmente, a detecção de metabólitos provenientes da degradação foi mensurada pela determinação do pH dos meios, na qual, principalmente os isolados leveduriformes mostraram capacidade de acidificar os meios. A identificação molecular foi realizada por sequenciamento das regiões conservadas 16S e 26S do rDNA. Por fim, um consórcio microbiano foi selecionado e adicionado em água marinha contendo 2% de petróleo (m/v). Este sistema foi mantido por 40 dias e a biodegradação dos hidrocarbonetos foi quantificada por GC-FID. Os resultados da bioaugmentação demonstraram uma redução de 25% nos TPHs após o fim do tratamento.

ABSTRACT

Oil is an organic compound consisting essentially of a mixture of hydrocarbons and it is considered one of the greatest sources of energy nowadays. The rising demand for petroleum derivative has increased its exploration. Consequently, the number of accidents involving oil spills and oil products has risen in nature, causing serious environmental problems. Thus, an alternative to mitigate the environmental impacts of oil spills is through bioremediation techniques. The bioremediation techniques are based on the use of microorganisms with potential for biodegrade compounds, being environmentally friendly and sustainable techniques. Therefore, the aim of this work was to select microorganisms able of grow in aquatic environments containing oil, as well as characterize potential degradation of these contaminants. For this, 19 microorganisms were isolated from previously contaminated soil with crude oil. In order to evaluate the ability of biodegradation of oil caused by each isolate, they were submitted to a pretest with TTC redox indicator, and three bacteria (BPH 1.4, BPH 1.5 and BPH 1.14) and three yeasts (BPH 2.1, BPH 2.2 and BPH 2.3) were selected for further subsequent tests. Was also performed a visual assessment of the solubilization of hydrocarbons by selected microorganisms in media containing bioaugmentation treatment and biostimulation and bioaugmentation treatments together. Since the six microorganisms showed potential degraders in these early stages, they were evaluated for the production of biosurfactants and was determined $IE_{24h}\% > 38\%$ and $IE_{24h}\% > 39\%$ in the presence and absence of microbial cells, respectively. The isolates were also capable of reducing the surface tension in the media used. BPH 1.4, BPH 1.5 and BPH 2.2 microorganisms were also able to produce biosurfactants of ramnolipids type. Additionally, metabolites detection from possible degradation was assessed by measuring the pH of the medias in which yeast isolates showed mainly acidify the medias. The molecular identification was performed by sequencing of the 16S and 26S conserved regions of ribosomal DNA. Finally, a microbial consortium was selected and added to the seawater containing 2% of oil (m/v). This system was maintained for 40 days and the degradation of the hydrocarbons was measured by GC-FID. The bioaugmentation results demonstrated a reduction of 25% of the TPHs after the end of treatment.

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria petroquímica ocupa um espaço de destaque no cenário sócio-econômico mundial devido a sua grande importância para o crescimento e desenvolvimento dos países, sendo impulsionada ainda mais pelos avanços tecnológicos (Cerqueira *et al.*, 2011). Desta forma, existe uma crescente demanda por produtos derivados do petróleo, aumentando o número de pontos de extração deste recurso de origem fóssil, tanto em terra quanto em alto mar.

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2013) o volume mundial de petróleo produzido em 2012 foi de 86,2 milhões de barris/dia. O Brasil tem-se destacado na área de produção de petróleo, por possuir diversas reservas petrolíferas em seu território, chegando a ocupar em 2012 a 13ª posição no ranking mundial dos maiores produtores (ANP, 2013; Petrobras, 2013).

Como consequência da grande exploração e produção de petróleo realizada atualmente, os índices de acidentes envolvendo derramamento de petróleo na natureza têm aumentado. Estes acidentes causam sérios problemas ambientais e grandes prejuízos para o bioma nativo das áreas contaminadas, por ser o petróleo composto por uma mistura complexa de compostos orgânicos (Atlas e Cerniglia, 1995; Cerqueira *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2012). Estes compostos são predominantemente formados por hidrocarbonetos com estruturas alifáticas, alicíclicas e aromáticas, sendo esta última, a classe de hidrocarbonetos de mais difícil degradação e responsável por conferir ao petróleo propriedades toxicológicas (Balachandran *et al.*, 2012; Borsato *et al.*, 2009; Clark e Brown, 1977; Khan *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2011).

Dessa forma, o tratamento de áreas contaminadas com estes compostos representa um grande desafio na atualidade. Em busca de uma alternativa sustentável para minimizar

os impactos ambientais gerados por estes acidentes, muitos pesquisadores estão estudando e aprimorando as técnicas de biorremediação. Esta técnica consiste na utilização de organismos vivos como plantas ou micro-organismos que metabolizam o poluente, e removem substâncias potencialmente nocivas ao bioma nativo das áreas contaminadas remediando o impacto negativo (Atlas, 1995; Crawford, 2006; De Lorenzo, 2008; Khan *et al.*, 2004; USEPA, 2012).

Uma grande variedade de micro-organismos tem sido descrita na literatura com capacidade de utilizar os hidrocarbonetos do petróleo como fonte única de carbono (Bento *et al.*, 2005; Das e Chandran, 2011; Zhu *et al.*, 2001). Outro aspecto positivo para a degradação de petróleo por estes micro-organismos é a produção de biossurfactantes, pois este melhora a dispersão do petróleo em água, aumentando a superfície de ação do micro-organismo (Jacques *et al.*, 2005; Rahman e Gakpe, 2008; Singh *et al.*, 2007; Van Hamme *et al.*, 2006). Alguns estudos têm comprovado que a degradação completa de hidrocarbonetos requer o uso de consórcios microbianos, com organismos procariotos e eucariotos, pois metabólitos transformados por uma determinada espécie podem resultar em substâncias úteis para outra espécie, ocorrendo interações de sinergismo no consórcio (Cerqueira *et al.*, 2011; Das e Chandran, 2011; Li *et al.*, 2009; Moscoso *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2006; Sharma e Rehman, 2009).

Neste contexto, o presente trabalho visa caracterizar micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo bruto, pela bioprospecção de um ambiente contaminado e formular um consórcio microbiano para utilização em áreas impactadas.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e composição do petróleo

O petróleo é uma fonte de energia de origem fóssil, não renovável, composto principalmente por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (Leahy e Colwell, 1990; Tyagi *et al.*, 2011; Vollhardt e Schore, 2004). Este composto possui grande importância em diversos setores e atualmente é considerado uma das maiores fontes de energia (Cerqueira *et al.*, 2011; Petrobras, 2012; Speight, 2014; Xu *et al.*, 2013).

Segundo Vecchia (2010), entre as principais características do petróleo, ou também chamado óleo cru, pode-se citar: ser uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com odor característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro.

O petróleo é um composto resultante de uma série de transformações biológicas, químicas e físicas, que ocorrem com a matéria orgânica. Durante o processo de formação do petróleo, compostos orgânicos que estão dispersos se acumulam por migração em reservatórios e assim, formam as jazidas petrolíferas (Speers e Whitehead, 1969; Speight, 2014; Tissot e Welte, 1984). Para que isso ocorra é necessária a presença de sedimentos originalmente abundantes em matéria orgânica e também transformações químicas e bioquímicas dos compostos (Vollhardt e Schore, 2004).

Segundo Tissot e Welte (1984), a formação do petróleo pode ser dividida em três principais etapas: diagênese, catagênese e metagênese (Figura 1). Na diagênese, processos ocasionados pela ação de micro-organismos resultam em insolubilização e desfuncionalização dos componentes da matéria orgânica. Dessa forma, ocorre uma elevação nas reações de condensação em decorrência do soterramento progressivo da matéria orgânica em conjunto com os minerais provenientes do solo. O querogênio,

composto formado por uma rocha sedimentar, rica em matéria orgânica insolúvel em água é o resultado deste processo.

Na catagênese ocorre uma elevação de temperatura e pressão em consequência do soterramento continuado da rocha sedimentar, ocasionando a degradação térmica do querogênio, dando origem a maior parte dos hidrocarbonetos que compõem o petróleo.

A metagênese ocorre somente em grandes profundidades, com condições extremas de pressão e temperaturas e parte dos hidrocarbonetos formados na etapa anterior passam por um rearranjo molecular, levando a formação de metano e resíduos de carbono, ocasionando composições diferentes do petróleo. Esta etapa corresponde ao início do metamorfismo (Killops e Killops, 2005; Peters e Moldowan, 1993).

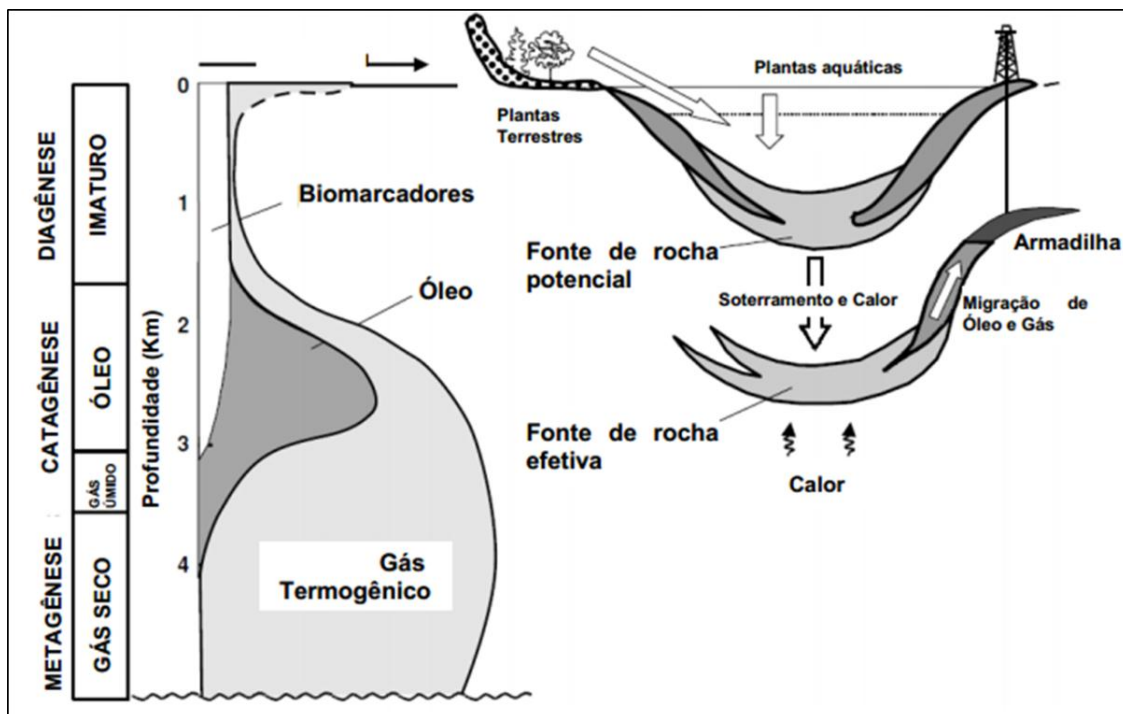


Figura 1: Evolução da matéria orgânica durante os processos de formação do petróleo. Fonte: adaptado de Peters e Moldowan (1993).

Cada óleo formado apresenta diferentes características, devido as diferentes condições que é exposto durante a sua origem, por isso, uma definição precisa da composição se torna impossível, considerando que não existem dois óleos exatamente idênticos (Speers e Whitehead, 1969; Vollhardt e Schore, 2004). Além disso, com o passar do tempo, as características originais do petróleo vem sofrendo modificações por processos geológicos e por ações antrópicas, o que tem acelerado a formação de novos compostos.

Conforme mencionado anteriormente, o petróleo é formado por milhares de compostos diferentes, sendo os hidrocarbonetos os principais componentes, atingindo cerca de 98% da composição total do petróleo (Clark e Brown, 1977). De acordo com Borsato *et al.* (2009), a composição dos hidrocarbonetos constituintes do petróleo é variável, podendo possuir de 83 a 87% de carbono e de 11 a 15% de hidrogênio, pequenas quantidades de nitrogênio (0 a 0,5%), enxofre (0 a 6%), oxigênio (0 a 3,5%), e mínimas porções de organometálicos também podem estar presentes.

A fração líquida do petróleo é comumente denominada de óleo cru, sendo esta formada por quatro classes principais de hidrocarbonetos: os hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (Balba *et al.*, 1998; Colwell, 1977; Leahy e Colwell, 1990).

A classe dos hidrocarbonetos saturados inclui alcanos lineares e ramificados, também chamados de alifáticos, e alcanos com estruturas cíclicas, denominados alicíclicos. Possuem uma cadeia de 1 a 40 carbonos, e são normalmente os constituintes mais abundantes em óleos crus. Fazem parte deste grupo de hidrocarbonetos os isoprenóides, formados por unidades repetidas de C5 (isopreno), e as suas formas mais comumente encontradas são C19 (pristano) e C20 (fitano) (Balba *et al.*, 1998; Killops e Killops, 2005).

A classe dos hidrocarbonetos aromáticos inclui compostos aromáticos monocíclicos, como por exemplo, o benzeno e o tolueno, e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs, *Polycyclic aromatic hydrocarbons*), como naftaleno, antraceno e fenantreno, os quais possuem dois ou mais anéis aromáticos (Killops e Killops, 2005; Vollhardt e Schore, 2004; Zhu *et al.*, 2001).

Já a classe das resinas e asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e elevada condensação de anéis aromáticos. São formados normalmente por compostos polares de nitrogênio, enxofre e oxigênio, como exemplo piridinas e tiofenos. Especificamente na fração dos asfaltenos, alguns metais como níquel, vanádio e ferro também podem estar associados (Balba *et al.*, 1998; Killops e Killops, 2005; Zhu *et al.*, 2001). A estrutura de alguns destes compostos pode ser observada na Figura 2.

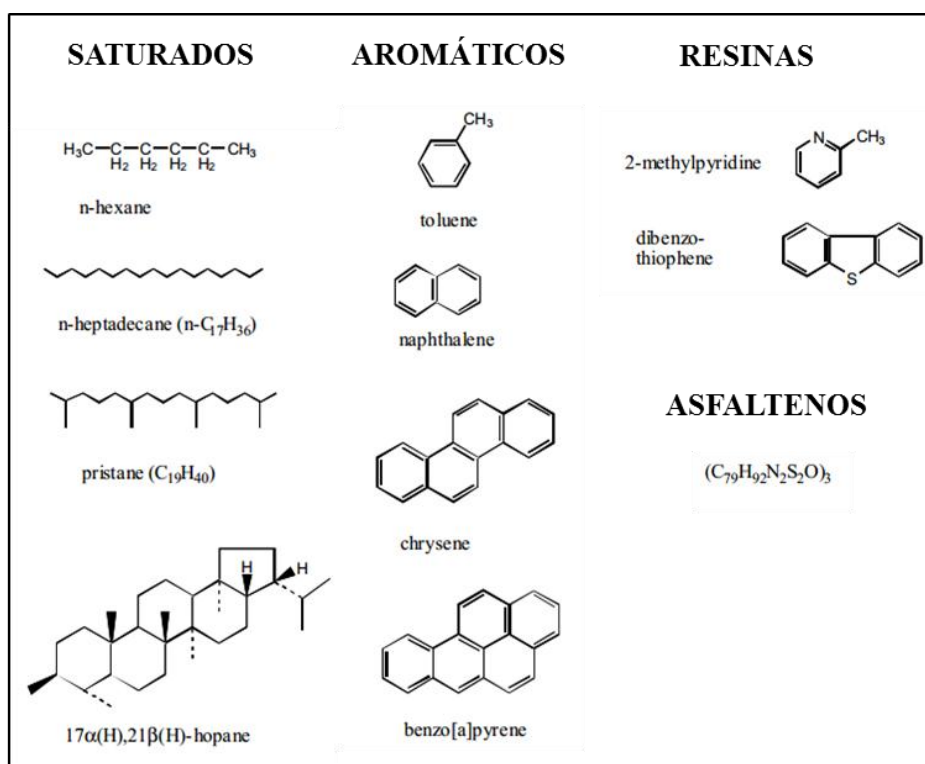






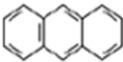
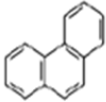
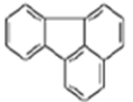
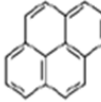
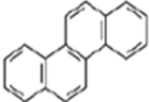
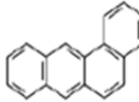
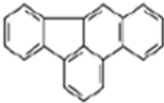
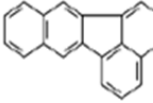
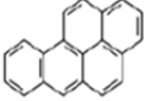
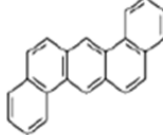
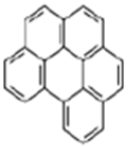
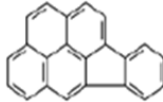
Figura 2: Compostos orgânicos representativos encontrados em óleo cru. Fonte: adaptado de Zhu *et al.* (2001).

Segundo o Instituto Americano do Petróleo (API, *American Petroleum Institute*) (API, 2001) os hidrocarbonetos do petróleo também podem ser classificados em dois grandes grupos mais abrangentes: o grupo dos compostos saturados e o grupo dos compostos insaturados.

Dentre os compostos orgânicos presentes no petróleo, os de maior preocupação são os PAHs, os quais contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do petróleo. Muitos PAHs apresentam potencial mutagênico, carcinogênico, teratogênico e outras propriedades tóxicas como bioacumulação e biomagnificação (Balachandran *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2004; Vollhardt e Schore, 2004). Os PAHs compreendem uma classe de compostos orgânicos constituídos por carbono e hidrogênio combinados em dois ou mais anéis aromáticos condensados (API, 2001). Atualmente, existem mais de 100 PAHs reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), este número é elevado devido à possibilidade de fusão de um número variado de anéis aromáticos e das diversas posições em que estes anéis podem se ligar entre si.

Dentre todos estes PAHs, 16 são listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) como poluentes prioritários (Tabela 1), podendo causar sérias ameaças para a vida marinha, a saúde humana e aos recursos ecológicos, alterando o equilíbrio ecológico que pode levar anos ou mesmo décadas para se recuperar (Chauhan *et al.*, 2008; Cohen, 2013; Park e Park, 2011).

Tabela 1: Nomenclatura, estrutura química e efeitos tóxicos dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários.

Nomenclatura	Estrutura	Efeito	Nomenclatura	Estrutura	Efeito
Nafteno		Tóxico	Acenaftileno		Mutagênico
Acenafteno		Mutagênico	Fluoreno		Mutagênico
Antraceno		Mutagênico	Fenantreno		Tóxico e Mutagênico
Fluoranteno		Carcinogênico e Mutagênico	Pireno		Carcinogênico e Mutagênico
Criseno		Carcinogênico e Mutagênico	Benzo (a) antraceno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo (b) fluoranteno		Carcinogênico e Mutagênico	Benzo (k) fluoranteno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo (a) pireno		Carcinogênico e Mutagênico	Dibenzo (a,h) antraceno		Carcinogênico e Mutagênico
Benzo (g,h,i) perileno		Carcinogênico	Indeno (1,2,3-cd) pireno		Carcinogênico

Fonte: adaptado de Sims *et al.* (1988).

1.2. Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

O termo Hidrocarboneto Total de Petróleo (TPH, *Total Petroleum Hydrocarbon*), refere-se à mistura complexa de hidrocarbonetos que compõe o petróleo cru (API, 2001; Zhu *et al.*, 2001).

De acordo com o Instituto Americano de Petróleo (API, 2001) o conceito de TPH baseia-se em dois princípios: o primeiro refere-se à utilização da técnica de fracionamento como uma opção para medir os constituintes da mistura de petróleo, onde, é somado tudo o que for determinado, para se obter um valor total; o segundo princípio refere-se ao fato de que os TPHs sejam todos os hidrocarbonetos contidos em uma amostra, detectados por uma técnica em particular. Além disso, o tamanho de suas cadeias carbônicas, provenientes das frações destiladas do petróleo, os hidrocarbonetos totais do petróleo podem ser divididos em três grupos: TPH-GRO, TPH-DRO e TPH-ORO (Tabela 2).

Tabela 2: Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH).

Definição	Faixa	Exemplo
TPH-GRO <i>(Gasoline Range Organics)</i>	C5 a C10	Gasolina
TPH-DRO <i>(Diesel Range Organics)</i>	C11 a C28	Óleo diesel
TPH-ORO <i>(Oil Range Organics)</i>	C20 a C36	Óleos lubrificantes

Os TPHs são empregados como parâmetro para a avaliação de contaminações provenientes de derramamentos de petróleo, devido à impossibilidade de uma avaliação individual dos compostos e a existência de diversas substâncias químicas nele presentes (TPHCWG, 1998). No entanto, análises de TPHs apresentam algumas restrições, devido à presença da chamada “mistura complexa não resolvida” (UCM, *Unresolved Complex*

Misture), que são componentes não identificados do petróleo (Marchal *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001).

1.3. Acidentes ambientais e Legislações Vigentes

Durante o século XX, o petróleo tornou-se a principal fonte de energia do mundo e a indústria do petróleo transformou-se em uma das mais importantes e influentes da atualidade. O petróleo é responsável por cerca de 32,9% de toda energia consumida no mundo (BP, 2012). Como consequência, tem havido uma crescente demanda por energia proveniente do petróleo, o que acarreta no aumento do número de pontos de extração deste recurso de origem fóssil, tanto no solo quanto em alto mar.

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2013), a Petrobrás apresentou uma média de crescimento anual na produção de 5,3% nos últimos 10 anos, e em 2012 o volume mundial de petróleo produzido foi de 86.2 milhões de barris/dia.

O Brasil possui diversas reservas petrolíferas, sendo a maior parte delas na região marítima, em lâminas d'água com profundidades maiores que as dos demais países produtores (Petrobras, 2012). Assim, nosso país tem se destacado na área de exploração do petróleo, alcançando a 13ª posição entre os maiores produtores mundiais em 2012 (ANP, 2013), com produção aproximada de 2,1 milhões de barris/dia em 2012, sendo o óleo diesel e a gasolina os principais derivados energéticos produzidos, correspondendo a 44,4% e 26,3%, respectivamente.

Como consequência da grande exploração e produção de petróleo atual, o índice de acidentes envolvendo esta matriz energética, tem se elevado causando sérios problemas

ambientais e grandes prejuízos para o bioma nativo, devido ao fato do petróleo ser uma substância de difícil degradação.

Entre as principais causas de acidentes ambientais estão os acidentes de navegação que resultam em extensos derramamentos de petróleo e seus derivados no ambiente aquático. Esses acidentes podem ser decorrentes de diversos fatores, nos quais pode-se destacar a falha humana, explosões, incêndios, fenômenos da natureza, estado precário das embarcações e navios, descumprimento das normas de segurança, entre outros.

A intensidade do impacto ocasionado pelo derramamento de petróleo e o tempo de recuperação da área atingida tende a ser diretamente proporcionais à quantidade de óleo presente em um ambiente ou local restrito. O petróleo, quando derramado em ambiente aquático, forma uma película entre o ar e a água, devido a sua característica hidrofóbica (*National Research Council*, 2003). Assim, de acordo com Fellenberg (1980) torna-se inacessível a oxigenação da água e a realização da fotossíntese por algas pela falta de luminosidade. Logo, o petróleo causa impactos físicos devido ao recobrimento, tais como os citados acima e impactos químicos, causados por substâncias tóxicas presentes na sua composição (Da Silva *et al.*, 2012). Observa-se também, como consequência de derrames de petróleo a dissolução dos hidrocarbonetos na água, tornando-os mais nocivos (Zhu *et al.*, 2001).

De acordo com a base de dados da Federação Internacional de Poluição por Proprietários de Petroleiros (ITOPF, *International Tanker Owners Pollution Federation*) (ITOPF, 2014) estima-se que, de 1970 a 2013, aproximadamente 5,74 milhões de toneladas de óleo foram lançados ao mar apenas por petroleiros.

O primeiro acidente ambiental que chamou a atenção da sociedade para este tipo de problema ocorreu em 1989 no Alasca, quando o petroleiro Exxon Valdez derramou em alto

mar cerca de 40 milhões de litros de petróleo, resultando na mortalidade de milhares de aves e mamíferos marinhos, ocasionando uma redução significativa na população de muitos organismos, e um grande impacto ambiental a longo prazo (Spies *et al.*, 1996).

Anos depois, em abril de 2010, no Golfo do México, ocorreu o maior derramamento de óleo em águas americanas, devido a explosão ocorrida na plataforma BP Deepwater Horizon, onde vazaram cerca de 4,9 milhões de barris do óleo no mar, causando um prejuízo de bilhões de dólares e um grande impacto ambiental. O vazamento foi contido apenas três meses após a explosão e o poço de petróleo foi fechado em setembro de 2010, levando a uma diminuição na presença de óleo na superfície, entretanto, uma grande deposição de petróleo em sedimentos e na orla costeira continuou sendo observada (Camilli *et al.*, 2010; Crone e Tolstoy, 2010).

Outro exemplo importante de acidente ambiental ocorreu em 2011 na Bacia de Campos, no Brasil, onde houve vazamento de um poço de petróleo operado pela empresa americana Chevron, no qual, estima-se que 3.700 mil barris de petróleo foram derramados (ANP, 2012).

Sabe-se que ambientes distintos, respondem de formas distintas a um mesmo contaminante, assim como um mesmo ambiente pode reagir de formas diferentes a diferentes contaminantes. Para avaliar os riscos ambientais de um contaminante é importante realizar a análise do deslocamento da mistura de hidrocarbonetos presentes no mesmo. Conforme decorre este deslocamento, pode-se avaliar se o grau de exposição aos seres humanos e aquáticos será maior ou menor (Zhu *et al.*, 2001).

Como mostrado, devido ao elevado número de acidentes ambientais causados por derramamentos de petróleo e seus derivados, se faz necessário a elaboração de soluções por parte dos órgãos responsáveis pela administração de problemas ambientais. Tais

medidas devem assegurar tanto o conhecimento do poluente quanto as características e os impactos causados pelo mesmo. Além disso, deve-se avaliar a criação e a aplicação de instrumentos necessários para reduzir os riscos à população e ao meio ambiente, visando as formas e níveis de intervenção mais adequados.

Segundo Casarini *et al.* (2001), diversos fatores são levados em consideração para que as diferentes abordagens sejam realizadas nos diferentes países com relação às áreas contaminadas. Entre estes fatores destacam-se o sistema legal e administrativo, as responsabilidades, as propriedades do solo, os históricos industriais, aspectos sociais e culturais, entre outros. Todos estes, definem as atitudes que devem ser tomadas em relação aos bens protegidos, as formas de uso, ocupação e reutilização do solo, além dos aspectos econômicos e a disponibilidade de recursos e também de tecnologias. As agências mundialmente conhecidas, por iniciar pesquisas e divulgação de materiais a respeito dos contaminantes derivados de produtos do petróleo são a USEPA, e a Comissão das Comunidades Europeias. Neste sentido, estas agências são consideradas referências em pesquisas e normas em torno deste tema. Entre as normas e as resoluções emitidas por esses órgãos podemos citar a Lista Holandesa que estabelece os valores de qualidade da água subterrânea e do solo. Esta lista tem sido utilizada por diversos países, inclusive o Brasil, como padrão para controle de qualidade da água e de solos.

No Brasil, as atividades referentes à exploração do petróleo e gás natural foram regulamentadas pela Lei Federal nº 9.478 (Brasil, 1997a), conhecida como “Lei do Petróleo” que dispõe sobre a Política Energética Nacional, e institui o Conselho Nacional de Política Energética e a ANP. Entre os principais objetivos desta lei, podemos citar a proteção ao meio ambiente e a conservação da energia, além do estabelecimento da ANP como órgão administrativo. Adicionalmente, também descreve sobre os direitos de

exploração e produção de petróleo e gás natural em território nacional, sendo todos pertencentes à União. Com a promulgação da Lei Federal nº 9.478 (Brasil, 1997a) estabeleceu-se que a ANP passaria a ser a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, sendo o órgão responsável por promover a regulação e a fiscalização das atividades econômicas realizadas pela indústria de petróleo, estando vinculada ao Ministério de Minas e Energia. Dessa forma, a ANP, tornou-se responsável por autorizar a prática de atividades de refinação, liquefação, regaseificação, carregamento, processamento, tratamento, transporte, estocagem e acondicionamento de petróleo e seus derivados.

Neste sentido, com relação às fiscalizações e licenciamentos ambientais, o órgão executor da política ambiental responsável por esta parte foi instituído pela Lei nº 7.735 (Brasil, 1989), que estabelece como tal o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA).

Adicionalmente, com o objetivo de minimizar os riscos de contaminação de ambientes aquáticos, terrestres e atmosféricos, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabeleceu através das Resoluções nº 273 e nº 420 (Brasil, 2000b; 2004), uma série de requisitos a serem atendidos pelas empresas integrantes do setor petrolífero no Brasil, entre eles a obrigatoriedade do licenciamento ambiental, a certificação dos equipamentos e os valores de referência de substâncias químicas aceitáveis para solos e águas. Seguindo este mesmo objetivo a Lei nº 9.478 (Brasil, 1997a), já previa que o concessionário seria obrigado a responsabilizar-se pelos atos de seus prepostos e indenizar todos e quaisquer danos decorrentes das atividades de exploração, desenvolvimento e produção, devendo ressarcir à ANP ou à União por quaisquer prejuízos causados.

Juntamente com o Decreto nº 2.953 (Brasil, 1999), que dispõe sobre o procedimento administrativo para aplicação de penalidades por infrações cometidas nas atividades relativas a indústrias do petróleo e ao abastecimento de combustíveis.

Conforme o exposto pela Lei Federal nº 9.966 (Brasil, 2000a) as empresas devem desenvolver planos de emergência para o caso de incidentes de contaminação por óleo no mar e em águas interiores. Esta lei estabelece também os princípios básicos para o transporte de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em locais sob jurisdição nacional, proibindo então a descarga de óleo e substâncias nocivas.

Sendo assim, o desenvolvimento do Plano de Ação de Emergência (PAE) objetiva proporcionar respostas rápidas e eficazes para o caso de eventuais situações de emergência que possam causar grande repercussão, reduzindo danos, tanto ao meio ambiente, quanto as pessoas e ao patrimônio.

Da mesma forma, o Plano de Emergência Individual (PEI) estabelece as diretrizes necessárias, que devem ser aplicadas, no caso de derramamentos e vazamentos de óleo em regiões costeiras para reduzir os eventuais impactos negativos ao meio ambiente, ao patrimônio público e privado, à saúde humana, bem como a imagem da empresa. No PEI estão definidos os procedimentos que devem ser realizados em resposta às emergências, assim como as atribuições e responsabilidades dos envolvidos, facilitando o pronto atendimento.

Por fim, a Resolução CONAMA nº 001 (Brasil, 1986) institui que as atividades realizadas a partir de recursos ambientais com potencial de degradação ou poluição ambiental deverão seguir o Estudo Prévio de Impacto Ambiental (EIA) e o Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) para que ocorra o seu licenciamento. Além disso, conforme a Portaria Conjunta MMA/IBAMA Lei nº 9.537 (Brasil, 1997b), o empreendedor deve

obrigatoriamente incluir no EIA/RIMA um capítulo sobre as alternativas de tecnologias mais limpas para reduzir os impactos na saúde do trabalhador e no meio ambiente.

1.4. Técnicas de remediação

Uma variedade de tecnologias pode ser utilizada na remediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados. Na ocasião de incidentes com liberação de grandes quantidades de petróleo, devem-se tomar primeiramente medidas de natureza física, como a remoção mecânica do óleo ou separação de água e óleo, por exemplo (Zhu *et al.*, 2001). Em seguida, o método químico pode ser utilizado, envolvendo técnicas como extração por solventes, precipitação, oxidação, neutralização e também com o uso de substâncias químicas capazes de dispersar o contaminante, os chamados surfactantes químicos (Fuller *et al.*, 2004; Riser-Roberts, 1998). No entanto, estes processos são onerosos e resultam em uma descontaminação incompleta.

Em contrapartida, os processos biológicos despontam entre os métodos mais promissores para o tratamento de uma variedade de contaminantes orgânicos e entre estes contaminantes destacam-se os hidrocarbonetos de petróleo (Liu *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 1999).

Para escolher qual a tecnologia de remediação a ser utilizada no caso de algum acidente é necessário conhecer a natureza química bem como as características físico-químicas do contaminante e as características do ambiente contaminado, e ainda fazer uma relação entre os custos de operação e as restrições de tempo. Dessa forma, cada ambiente contaminado requer uma combinação de procedimentos que permitam a otimização do processo de remediação (Bento *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 1999).

As técnicas de remediação têm sido classificadas em duas categorias: (1) *in situ*, (2) *ex situ*. Na primeira categoria, a descontaminação é realizada no próprio local impactado, o que resulta numa diminuição dos custos. Na segunda categoria, os resíduos são transportados até um local próprio para remediação, que se encontra localizado distante da fonte poluidora (Boopathy, 2000). Geralmente, a utilização da remediação *ex situ* está relacionada à ocorrência de altas concentrações de contaminantes recalcitrantes, tornando-se então, necessária a utilização de técnicas mais eficientes para a recuperação desses resíduos.

1.4.1. Biorremediação

Por definição, o processo de biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas que aparece como uma alternativa de descontaminação de áreas impactadas, oferecendo a possibilidade de degradar contaminantes tóxicos, utilizando atividades biológicas de micro-organismos, como bactérias e fungos, com capacidades metabólicas e fisiológicas. Estes micro-organismos obtêm fonte de carbono e energia a partir de compostos orgânicos poluentes nocivos à saúde humana e aos ecossistemas (Atlas, 1995; Crawford, 2006; De Lorenzo, 2008; USEPA, 1996; 2012).

Existem diversas estratégias de biorremediação, que podem ser aplicadas tanto *in situ* quanto *ex situ*, entre elas destacam-se:

- *Biosparging*: Técnica de biorremediação *in situ* com a finalidade de fornecer oxigênio e nutrientes aos micro-organismos aeróbios, através de uma injeção de ar

e/ou nutrientes na zona insaturada aumentando a atividade biológica nativa (Kirtland e Aelion, 2000; Rizzo *et al.*, 2006).

- *Bioventilação*: Técnica semelhante ao *Biosparging*, também utilizando injeção de ar na zona não saturada, porém esta injeção é feita com baixas taxas de oxigênio, com o objetivo de maximizar a biodegradação e diminuir a liberação de contaminantes voláteis a superfície (Boopathy, 2000; Kirtland e Aelion, 2000; Rizzo *et al.*, 2006).
- *Biorreatores*: Técnica *ex situ*, onde se utiliza um sistema fechado, controlando assim as condições bióticas e abióticas. Para isso, é necessária a remoção e o transporte das amostras contaminadas. Este processo é muitas vezes incrementado com a adição de nutrientes e oxigênio (Boopathy, 2000; Khan *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2006).
- *Biopilhas*: Forma de tratamento *ex situ*, onde ocorre o empilhamento de solos contaminados. Dentro deste sistema é possível estimular a atividade microbiana através de aeração, da adição de minerais e controle da umidade. Para aumentar a taxa de biodegradação do recalcitrante pode-se também controlar temperatura e pH. Normalmente as biopilhas formadas possuem cerca de 1 a 3 m e são recobertas de material impermeável (Boopathy, 2000; Khan *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2006).
- *Landfarming*: Tecnologia amplamente utilizada para o tratamento de resíduos industriais perigosos, em especial resíduos petroquímicos. Necessita de grandes extensões de solo, que ficam organizadas em células impermeabilizadas. Este

sistema é baseado na aplicação de contaminantes na camada superficial do solo, onde estes são misturados e então periodicamente o solo é revolvido para que haja a aeração necessária para a atividade biológica e homogeneização dos contaminantes com o solo. Neste sistema pode ser realizado ainda a correção do pH, da umidade e das concentrações dos nutrientes, melhorando seu desempenho (Boopathy, 2000; Chagas-Spinelli *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2005; Nikolopoulou *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2006).

- *Fitorremediação*: Técnica que emprega plantas para remediação de solos ou águas contaminadas por metais, compostos orgânicos e radionuclídeos, onde os contaminantes podem ser acumulados ou absorvidos em tecidos vegetais por meio de fitoextração. Este processo pode ocorrer de duas formas: através da remoção do poluente pela própria planta, ou pela degradação ou transformação dos resíduos por micro-organismos colonizadores de suas raízes. Após o tratamento, a vegetação é colhida e geralmente queimada, o que diminui a contaminação em até 95%. Esse sistema de remediação também pode auxiliar na proteção do solo contra erosão e infiltração, minimizando os riscos de espalhamento dos contaminantes. Apesar de este tratamento ser bastante atraente, consiste em um processo lento, necessitando de diversas colheitas, além disso, algumas vezes as raízes das plantas não atingem a profundidade de toda a contaminação (Crawford, 2006; Khan *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; Trapp e Karlson, 2001).
- *Atenuação Natural*: Processo onde ocorre o tratamento dos contaminantes *in situ*, com base em eventos naturais como a biodegradação, diluição, volatilização e absorção, ocasionando a descontaminação dos ambientes. A microbiota nativa do

próprio local é utilizada para realizar a biorremediação, dessa forma, os fatores bióticos e abióticos do próprio sistema são responsáveis pela eficiência da biodegradação. Devido ao fato deste processo necessitar de um longo período de tempo, é necessário que ocorra um monitoramento adequado de longo prazo, o que pode encarecer o processo, além disso, a pluma de contaminação pode acabar migrando (Boopathy, 2000; Khan *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2006; USEPA, 1996).

- *Bioestimulação*: Estratégia amplamente utilizada para a recuperação de áreas impactadas, que consiste na correção das condições nutricionais do ambiente contaminado, estimulando a atividade e proliferação da população microbiana. Para isso, é adicionado ao sistema alguns dos principais macronutrientes, como por exemplo, nitrogênio e fósforo para se estabelecer relações adequadas de carbono:fósforo:nitrogênio para o desenvolvimento microbiano. O nitrogênio é primariamente utilizado para o crescimento celular, ou como acceptor alternativo de elétrons, sendo comum suplementar os meios com uréia, cloreto de amônio e nitrato de amônio, por serem fontes importantes de nitrogênio. O fósforo é o segundo nutriente mais utilizado em processos de biorremediação e pode ser adicionado ao meio na forma de potássio, fosfato de sódio e ácido orto-fosfórico (Bento *et al.*, 2005; Boopathy, 2000; Chagas-Spinelli *et al.*, 2012; Trindade *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001).
- *Bioaugmentação*: Técnica que visa auxiliar na capacidade degradativa de uma matriz contaminada, através da introdução de micro-organismos específicos com potencial capacidade de degradar o contaminante alvo com o objetivo de aumentar a taxa de biodegração. Pode ser utilizada através do inóculo de uma cultura microbiana pura,

adição de um consórcio microbiano pré-adaptado, introdução de micro-organismos geneticamente modificados, e por adição de genes relacionados à biodegradação em um vetor transferido para os micro-organismos endógenos. A seleção dos micro-organismos deve ser baseada no seu potencial metabólico e na capacidade das células microbianas de resistirem à ambientes de estresse elevado. Esta estratégia de remediação tem estimulado pesquisas em busca de micro-organismos capazes de degradar poluentes. Em geral, consórcios microbianos são mais eficientes na redução de hidrocarbonetos contaminantes do que micro-organismos individuais, principalmente pela capacidade que diversos micro-organismos têm de biotransformar compostos em intermediários para o metabolismo de outros micro-organismos e a ação em sinergismo, aumentando assim, a degradação dos poluentes (Bento *et al.*, 2005; Boopathy, 2000; El Fantroussi e Agathos, 2005; Molina *et al.*, 2009; Rizzo *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2001).

Existem controvérsias na literatura sobre qual seria a estratégia de remediação mais eficiente. Porém, as técnicas mais utilizadas são a atenuação natural, a bioestimulação e a bioaumentação, assim como, as possíveis combinações entre elas. Diversos autores têm utilizado estas técnicas na remediação de ambientes contaminados com compostos orgânicos (Bento *et al.*, 2005; Boon *et al.*, 2003; Dybas *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2004; Hosokawa *et al.*, 2009; Mckew *et al.*, 2007; Mrozik e Piotrowska-Seget, 2010; Ueno *et al.*, 2007).

1.5. Produção de biossurfactantes

Um dos principais problemas que os micro-organismos enfrentam na metabolização de hidrocarbonetos é tornar a fonte de carbono hidrofóbica acessível para a célula (Cameotra e Singh, 2008; Hommel, 1990). A eficiência da biorremediação torna-se comprometida em função da elevada tensão interfacial e da baixa solubilidade destes compostos. Nesse contexto, os surfactantes aumentam a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e demais compostos orgânicos hidrofóbicos para ação dos micro-organismos. Estas moléculas têm como principal característica serem compostos anfipáticos, que apresentam uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica na mesma molécula, que tornam os surfactantes capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (Cameotra e Singh, 2008; Hommel, 1990; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). A parte hidrofílica faz com que os surfactantes se solubilizem em água, enquanto a parte hidrofóbica faz com que eles se concentrem na interface, como podemos observar na Figura 3.

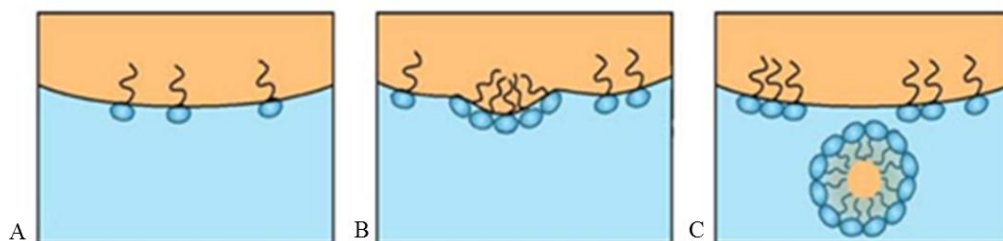


Figura 3: Mecanismo de solubilização de hidrocarbonetos dentro de micelas de surfactantes. (A) a concentração de hidrocarbonetos aumenta e o espaço disponível diminui, surfactantes tendem a se organizar e agregar. (B) Ponto chamado de “concentração micelar crítica” (CMC) no qual as micelas são formadas capturando os hidrocarbonetos para seu centro hidrofóbico (C) hidrocarbonetos dispersos, tornando-se mais disponíveis para assimilação. Fonte: Perfumo *et al.* (2010).

Tais características conferem aos surfactantes mecanismos que alteram as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, além de formar microemulsões as quais auxiliam a solubilizar os hidrocarbonetos (Desai e Banat, 1997; Liu *et al.*, 2010; Mulligan, 2009; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011; Swannell *et al.*, 1996).

Os surfactantes considerados eficientes apresentam uma baixa concentração micelar crítica (CMC) (Figura 4). A CMC é definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação micelar (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

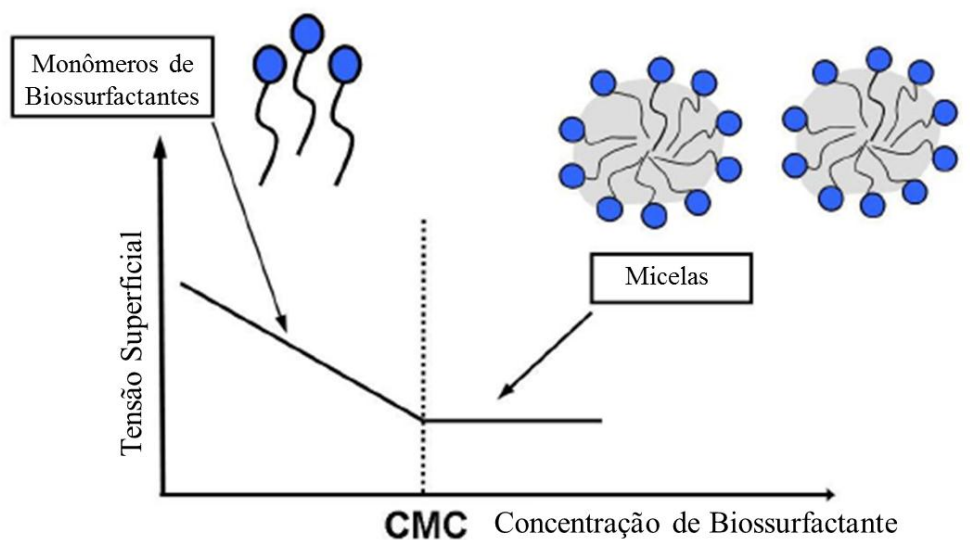


Figura 4: Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do contaminante com a concentração de surfactante. Fonte: adaptado de Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011).

Em um tratamento de biorremediação, surfactantes sintéticos e naturais podem ser utilizados. Os surfactantes sintéticos são amplamente utilizados em uma variedade de aplicações, e em sua grande parte são derivados do petróleo. Entretanto, estes surfactantes químicos apresentam algumas limitações como, por exemplo, alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiência somente em pequenas faixas de pH e temperatura (Cameotra e Singh, 2008; Desai e Banat, 1997). Devido à toxicidade dessas moléculas,

quando empregadas na descontaminação ambiental podem representar uma fonte adicional de contaminação (Cameotra e Singh, 2008). Em função desses fatores, há um crescente interesse na utilização de surfactantes de origem microbiana, os chamados biossurfactantes.

Biossurfactantes são compostos biológicos encontrados intracelularmente ou como parte da membrana celular de certos micro-organismos, podendo também ser secretados para o meio extracelular. São produzidos por uma grande variedade de micro-organismos de forma constitutiva ou induzida, a partir de diversos substratos, incluindo açúcares, óleos e resíduos (Cameotra e Singh, 2008; Mariano *et al.*, 2008; Owsianiak *et al.*, 2009; Rahman e Gakpe, 2008; Ruggeri *et al.*, 2009).

Os biossurfactantes são constituídos principalmente por glicolipídeos, mas também por lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros ou moléculas poliméricas e particuladas (Bento *et al.*, 2008; Biermann *et al.*, 1987; Colla *et al.*, 2010; Desai e Banat, 1997; Mulligan, 2009; Price *et al.*, 2012).

Estas substâncias podem ser agrupadas em duas grandes categorias: moléculas de baixo peso molecular (tensoativos), que apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial e interfacial, e moléculas de alto peso molecular (bioemulsificantes), que são efetivos estabilizadores de emulsões óleo em água, aumentando a solubilidade do contaminante com a fase aquosa (Mulligan, 2009; Rahman e Gakpe, 2008; Van Hamme *et al.*, 2006).

Além dessa classificação em duas grandes categorias, os biossurfactantes possuem uma classificação de acordo com sua origem microbiana e composição química, ao contrário dos surfactantes sintéticos, que são classificados apenas conforme seu grupamento polar (Rahman e Gakpe, 2008).

O potencial de utilização dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: solubilização, emulsificação, capacidade espumante, detergência, lubrificação e dispersão de fases (Maier e Soberon-Chavez, 2000; Singh *et al.*, 2007; Van Hamme *et al.*, 2006).

A aplicação de surfactantes de origem biológica tem sido mais aceitável, por estes apresentarem maior especificidade e biocompatibilidade ao substrato, baixa toxicidade, natureza biodegradável, eficiência em valores extremos de pH, temperatura e salinidade (Cameotra e Singh, 2008; Desai e Banat, 1997; Ferhat *et al.*, 2011). Em alguns casos, são ainda mais vantajosos que os surfactantes químicos por reduzirem mais expressivamente a tensão superficial (Ferhat *et al.*, 2011).

Portanto, existe um crescente interesse na utilização de biossurfactantes em processos como tratamentos de biorremediação, dispersão de derrames de óleos, mobilização e remoção de resíduos de óleos em tanques de estocagem, bem como na recuperação terciária de petróleo (Nitschke e Pastore, 2002).

Já estão descritos na literatura diversos micro-organismos produtores de biossurfactantes, o que demonstra o papel destes na aceleração da degradação de contaminantes.

1.6. Degradação dos hidrocarbonetos do petróleo e micro-organismos utilizados

Conforme já exposto anteriormente, acidentes ambientais ocasionados por derramamento de petróleo causam sérios problemas a fauna e a flora. Diante desses acidentes, o petróleo e seus derivados que se encontram em contato com a água e/ou o solo sofrem algumas transformações chamadas de intemperização (Zhu *et al.*, 2001). Dessa

forma, logo após o derrame, ocorre uma evolução primária que afeta características físicas do óleo, como por exemplo, densidade, viscosidade e solubilidade, não alterando inicialmente a natureza química dos compostos. Processos como espalhamento da mancha de petróleo, dissolução das frações solúveis, dispersão, emulsificação, evaporação e sedimentação podem ocorrer (Figura 5). Em seguida, ocorre a chamada evolução secundária, que engloba processos mais lentos atuando sobre os hidrocarbonetos, como a oxidação. Esta etapa pode ter duração de meses até anos (Zhu *et al.*, 2001).

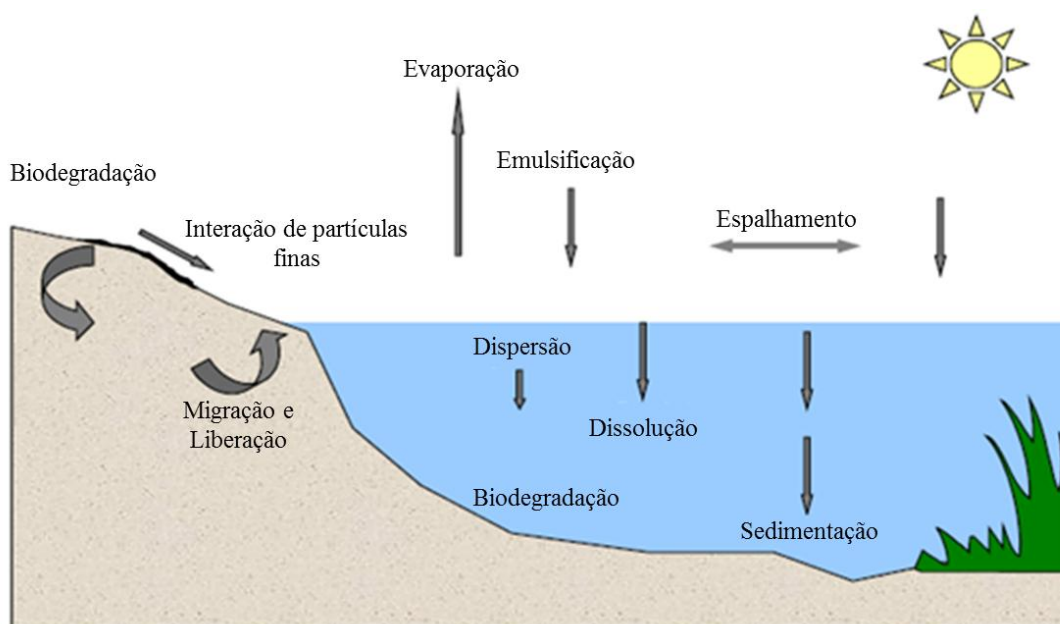


Figura 5: Processos de intemperização que ocorrem após um derramamento de petróleo. Fonte: adaptado de Zhu *et al.*, (2001).

Algumas condições específicas como, tempo, profundidade, correntes e habitats de cada ambiente podem alterar a eficiência destes processos. Ainda durante os estágios iniciais após o derramamento de petróleo e seus derivados no ambiente, ocorre um processo de evaporação, que remove os componentes mais voláteis que encontram-se presentes no óleo. Dependendo da composição do óleo derramado, até 50% destes

compostos podem ser evaporados nas primeiras 12 horas após o derrame (Zhu *et al.*, 2001). Outro processo que ocorre é chamado de foto-oxidação, onde então, o oxigênio é exposto à luz solar reagindo com os componentes do óleo. Isso leva à transformação de compostos mais complexos em compostos mais simples, que tendem a ser mais solúveis em água, permitindo que estes sejam removidos do local contaminado por outros mecanismos, como por exemplo, a biorremediação (Zhu *et al.*, 2001).

Existem diversas espécies de micro-organismos distribuídas na natureza, capazes de oxidar hidrocarbonetos de petróleo, entre estes destacam-se as bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Vale ressaltar que a biodegradação é um importante mecanismo de remoção de componentes não voláteis do petróleo, porém, este é um processo lento, que necessita de vários meses para que haja uma degradação significativa das frações de óleo (USEPA, 2012). Pode-se dizer que a biodegradação completa ocorre quando uma substância é completamente metabolizada pelos micro-organismos. Neste processo, obtêm-se como resultado a produção de dióxido de carbono, metano, água e sais minerais (Aluyor e Ori-Jesu, 2009; Atlas e Cerniglia, 1995; Zhu *et al.*, 2001).

Diversas vias metabólicas encontram-se relacionadas com a degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos aeróbicos. Uma etapa fundamental é a introdução de um ou dois átomos de oxigênio molecular ao hidrocarboneto pelas enzimas chamadas oxigenases, essa oxidação torna o hidrocarboneto mais solúvel em água, gerando sítios reativos na molécula para que mais reações possam acontecer (Atlas, 1981; Gibson, 1984; Vasconcelos, 2006).

Essas oxigenases responsáveis pela oxidação dos hidrocarbonetos podem ser classificadas em dois subgrupos: as monoxigenases e as dioxigenases. As monoxigenases, iniciam a biodegradação dos alcanos (as cadeias mais lábeis dos hidrocarbonetos) através

da ação de enzimas alcano-hidroxilases, que inserem um grupo hidroxila na cadeia hidrocarbônica alifática. Esta hidroxilação pode ocorrer nas regiões terminais, subterminais ou biterminais dos compostos lineares e ramificados, alicíclicos, alquil-cicloalcanos ou terpenos (Figura 6), clivando preferencialmente as ligações entre carbonos e hidrogênios (Funhoff e Van Beilen, 2007; Van Beilen e Funhoff, 2007). O resultado inicial da oxidação é a formação de um álcool, seguido por um aldeído e por fim um ácido graxo, que é o principal intermediário da biodegradação de alcanos (Belhaj *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2001).

Estes ácidos graxos formados podem ser metabolizados por rotas de biodegradação de ácidos carboxílicos, onde a molécula complexa é clivada em moléculas menores, que podem servir como fonte de carbono para outros micro-organismos (Vasconcelos, 2006).

A classe das enzimas alcano-hidroxilases pode ser separada em dois grupos: as alcano-hidroxilases 1 (AH1), que oxidam as cadeias curtas e médias de alcanos, e as alcano-hidroxilases 2 (AH2), que pertencem a maioria das enzimas *alkB*, que oxidam as cadeias longas (Amouric *et al.*, 2010; Beilen e Funhoff, 2005).

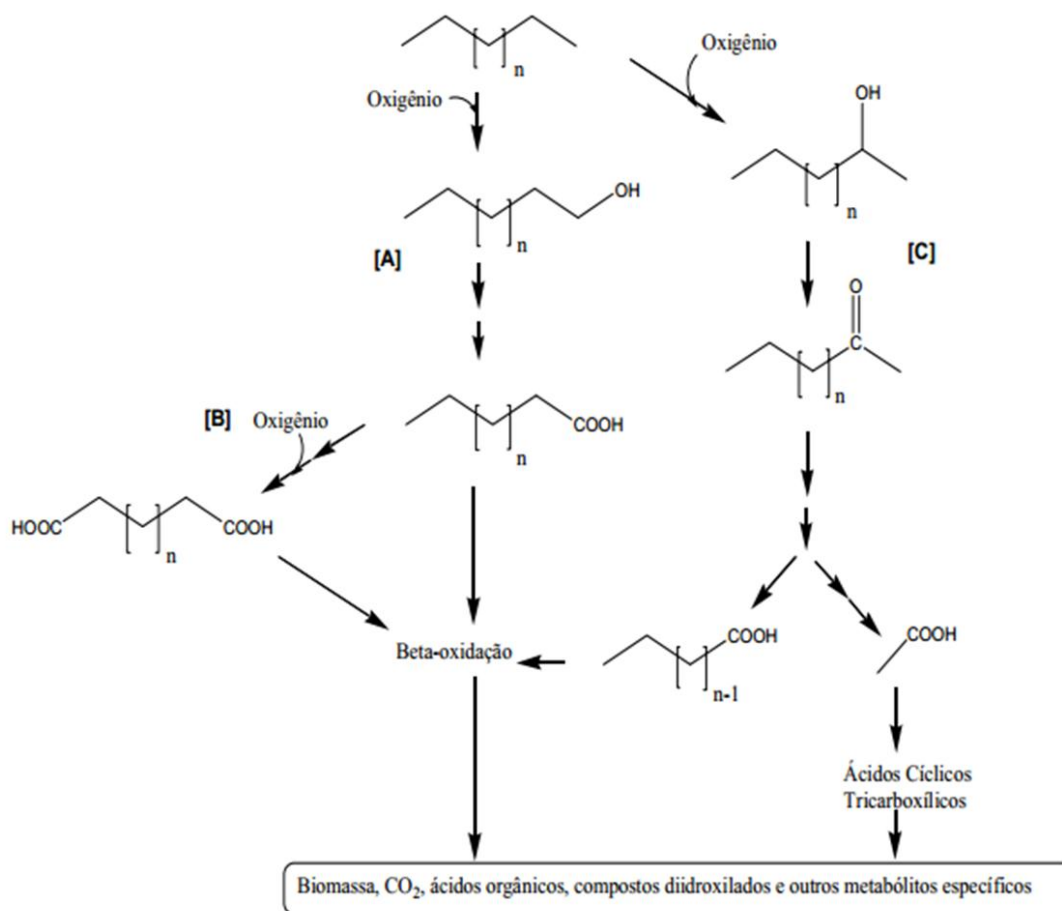


Figura 6: Biodegradação aeróbia dos alcanos: (A) Oxidação terminal conduz à formação de ácidos graxos pela rota β -oxidação. (B) Uma alcano-hidroxilase pode atuar por processo de oxidação biterminal, transformando intermediários em ácidos dicarboxílicos. (C) Oxidação subterminal que gera um álcool secundário. Fonte: Vasconcelos (2006).

Por sua vez, as enzimas do segundo subgrupo das oxigenases, as dioxigenases, são as responsáveis pela biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos, quando estes hidrocarbonetos são modificados pela adição de um ou dois átomos de oxigênio (Harayama *et al.*, 1992). Essa classe de enzimas também pode ser dividida em dois grupos: as enzimas periféricas e as enzimas de fissão. As enzimas periféricas realizam a adição dos átomos de oxigênio no substrato, oxidando este a um número bastante limitado de intermediários (Harayama *et al.*, 1992). Já as enzimas de fissão são responsáveis por

reconhecer estes intermediários e clivar seu anel aromático, que pode acontecer de duas maneiras como ilustrado na Figura 7.

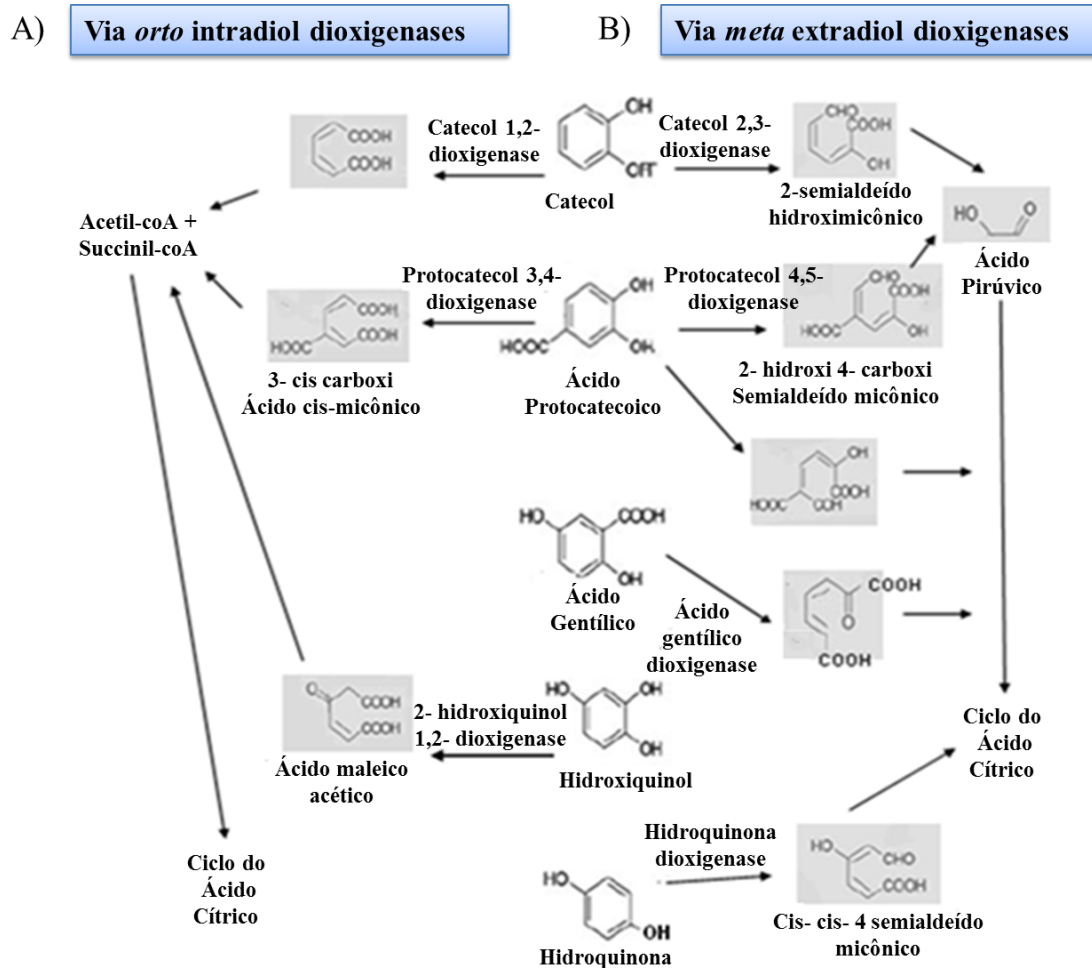


Figura 7: Biodegradação aeróbia dos hidrocarbonetos aromáticos. (A) Clivagem na posição *orto* entre dois grupos hidroxila, pela ação das intradiol dioxigenases. (B) Clivagem na posição *meta* entre o átomo de carbono e a hidroxila, pela ação das extradiol dioxigenases. Fonte: adaptado de Dagley (1986).

Como observado na Figura 7, as enzimas responsáveis pela clivagem na posição *orto* são as intradiol dioxigenases e fazem parte deste grupo as enzimas as 1,2-Catecol Dioxigenases (C1,2O) e 3,4-Protocatecol Dioxigenases (P3,4O). Durante a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos através da clivagem na posição *meta*, ocorre a ação do

grupo de enzimas das extradiol dioxigenases, cujo principal representante é a 2,3- Catecol dioxigenases (C2, 3O) (Bertini *et al.*, 1995). Após a clivagem dos compostos aromáticos, estes são transformados em intermediários de rotas metabólicas do ciclo do ácido cítrico (Bamforth e Singleton, 2005). A Figura 8 ilustra o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos pelos dois grupos de dioxigenases citados.

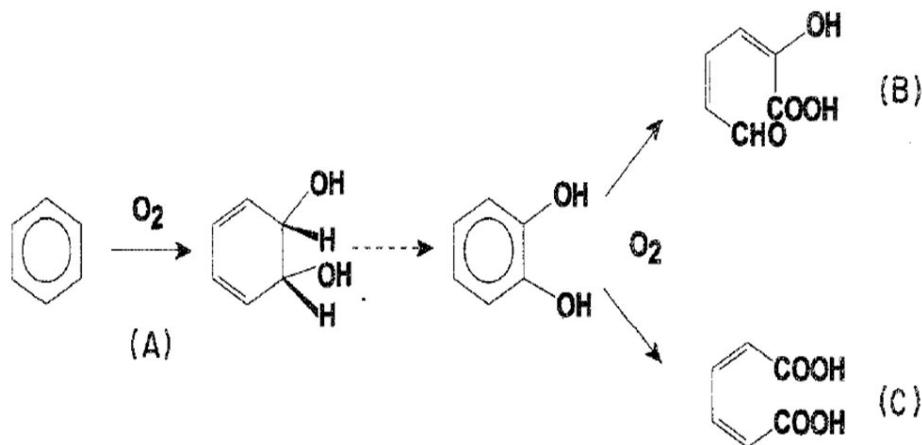


Figura 8: Degradação de hidrocarbonetos aromáticos por micro-organismos: (A) Hidroxilação de Dioxigenases (enzimas periféricas); Clivagem de intermediários centrais por diferentes dioxigenases (enzimas de fissão): (B) Clivagem na porção *meta* por extradióis; (C) Clivagem na posição *orto* por intradióis. Fonte: Bertini *et al.* (1995).

Com relação à biodegradação microbiana, os hidrocarbonetos de petróleo diferem quanto a sua susceptibilidade, sendo os alcanos não ramificados, alcanos ramificados e aromáticos de baixo peso molecular os mais facilmente biodegradados (Das e Mukherjee, 2007; Das e Chandran, 2011; Zhu *et al.*, 2001).

Por outro lado, alguns estudos demonstram que compostos como os PAHs, por terem uma maior estabilidade química são mais resistentes à degradação microbiana (Johnsen *et al.*, 2005).

Segundo Atlas (1981) e Zhu *et al.* (2001), diferentes micro-organismos conferem habilidades distintas de degradação de hidrocarbonetos, sendo alguns capazes de degradar

compostos alifáticos, outros compostos aromáticos e ainda algumas espécies podem apresentar uma característica atípica de biodegradar ambos os compostos.

Com base em relatos da literatura, as bactérias com capacidade de degradação de hidrocarbonetos com maior relevância tanto em ambientes terrestres quanto marinhos são representantes dos gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cornybacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Vibrio*. Entre os fungos, os que possuem maior capacidade de degradação são dos gêneros: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Trichoderma* (Balba *et al.*, 1998; Bento *et al.*, 2005; Leahy e Colwell, 1990).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de biorremediação de micro-organismos em ambientes aquáticos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar micro-organismos que apresentem capacidade de sobreviver em ambientes contendo petróleo;
- Verificar quais destes micro-organismos apresentam maior capacidade de biodegradar petróleo em meios de cultivo contendo água marinha e água destilada, através de tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação;
- Determinar a produção de biosurfactantes pelos micro-organismos isolados;
- Identificar os micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos;
- Testar a eficácia de um consórcio microbiano para a degradação de hidrocarbonetos em ambientes contaminados;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção da Amostra

Para o desenvolvimento deste estudo, a amostra de petróleo foi fornecida pela Refinaria Alberto Pasqualini – REFAP, localizada em Canoas - Rio Grande do Sul, Brasil. A água marinha utilizada nos ensaios foi coletada no município de Xangri-lá - RS, na localidade de Marina-Maristela (-29.829895, -50.049385) e as amostras de solo (100 g) (2 lotes) para a obtenção dos micro-organismos, foram coletadas no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) de Porto Alegre - RS.

3.2. Isolamento dos micro-organismos

Para a obtenção dos micro-organismos foi realizado o isolamento e seleção destes de cada lote de solo coletado. Em um erlenmeyer foi adicionado uma mistura de 1 g de solo (previamente homogeneizado) e 20 g de petróleo. Este sistema foi mantido sob agitação de 200 rpm por 21 dias em temperatura de 30°C em plataforma rotatória, e foi submetido a transferências para novos meios a cada 7 dias. Após esse período, alíquotas de 100 µL dessa mistura foram coletadas e submetidas à diluições decimais sucessivas (10^{-1} a 10^{-7}). Posterior a esta etapa, foi realizado a semeadura (50 µL) por espalhamento, das respectivas alíquotas diluídas, em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio, 2% de Agar) e Agar Batata Dextrose (BDA) (20% de infusão de batatas, 2% de dextrose, 3% de Agar). Finalmente, as placas foram incubadas em estufa a 30°C por cinco dias. As colônias de micro-organismos que se

desenvolveram nestas condições foram transferidas para novos meios, sendo estas isoladas pela técnica de esgotamento, a fim de se obter colônias puras. Os micro-organismos isolados foram então mantidos sob refrigeração a 4°C.

3.3. Avaliação preliminar da biodegradação de hidrocarbonetos

Após o isolamento dos micro-organismos resistentes a ambientes contendo petróleo bruto, foram realizados testes para avaliar previamente a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

3.3.1. Utilização do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

Para avaliar a capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos para cada micro-organismo isolado, a técnica do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) foi utilizada, com base no método de Braddock e Catterall (1999). Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de 20 mL, onde em cada tubo foram adicionados 9,9 mL de meio mineral 1 (MM1) (Apêndice A1) autoclavado por 20 min a 120°C, com 20% de solução de TTC filtrado em membrana de 0,22 µm. Após a mistura o pH do meio foi ajustado para 7,2. Então, foi adicionado 2% (m/v) de petróleo em relação ao meio de cultura, acrescido de um inóculo padronizado de 10^7 células/mL de micro-organismo. Este teste foi realizado em triplicatas biológicas para todos os isolados. Para o controle negativo utilizou-se água estéril substituindo o inóculo.

Os tubos de ensaio foram recobertos por papel alumínio para evitar a foto-oxidação do indicador-redox e do próprio petróleo. As amostras foram incubadas em estufa a 30°C

por até 7 dias e homogeneizadas periodicamente. A mudança de coloração do indicador foi monitorada nos tempos de 48, 96 e 168 h.

3.3.2. Teste prévio em placa para seleção de linhagens degradadoras de petróleo

O potencial biodegradador de petróleo dos micro-organismos isolados, também foi observado através de um segundo teste rápido. Os micro-organismos foram inoculados em seis meios de cultura diferentes (Tabela 3), na presença e na ausência de petróleo, com tratamentos de bioaumentação e bioestimulação.

Tabela 3: Meios de cultura para a inoculação dos micro-organismos.

Meio de Cultura	Composição (%)
Água destilada	-
Água marinha	*
Água marinha com nutrientes ^(a)	0,1% de fosfato de potássio monobásico e 0,1% de nitrato de amônio.
Água destilada com nutrientes ^(a)	0,1% fosfato de potássio monobásico e 0,1% de nitrato de amônio.
Meio mínimo	0,2% de dextrose, 0,1% de fosfato de sódio dibásico, 0,5% de peptona e 0,01% de sulfato de magnésio.
Meio mínimo com salinidade	0,2% de dextrose, 0,1% de fosfato de sódio dibásico, 0,5% de peptona, 0,01% de sulfato de magnésio e 3,5% de cloreto de sódio.

^(a) (Bento *et al.*, 2005; Chagas-Spinelli *et al.*, 2012; Trindade *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001).

* Meio marinho natural.

Foi preparado um pré-inóculo líquido inicial de 24 h de cada micro-organismo a ser testado, em meio LB para as bactérias e GYMP (2% de dextrose, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de sódio monobásico) para as leveduras. Foram realizadas duas lavagens das células com água destilada estéril, e estas foram posteriormente ressuspensas em 5 mL de cada meio a ser inoculado. 10^7 células/mL foram inoculadas em cada meio contaminado com 2% de petróleo em placa de polipropileno contendo 24 poços. As placas foram incubadas em shaker sob agitação de 90 rpm por um período de 7 dias a 30°C. Para os controles negativos, água estéril foi utilizada substituindo o inóculo.

Ao final do ensaio, a avaliação dos dados foi realizada por análise visual da degradação e da solubilização do petróleo.

3.4. Ensaio de biorremediação

Os experimentos de biorremediação foram realizados com a finalidade de avaliar a produção de biossurfactantes e a cinética de crescimento pelos micro-organismos selecionados. Para isto, foram realizados os seguintes tratamentos: controle (meios sem células microbianas), bioaugmentação (meios com 10^7 células microbianas/mL) e bioaugmentação juntamente com bioestimulação (meios com 10^7 células microbianas/mL e com adição de nutrientes, conforme citado na Tabela 3). Todos os tratamentos foram realizados com uma contaminação de 2% (m/v) de petróleo em relação aos meios de cultivo contendo água destilada e água marinha. A água marinha foi previamente filtrada, para retirar sedimentos. Os isolados foram inoculados previamente em meio rico em nutrientes, LB para as bactérias e GYMP para as leveduras, por 24 h a 30°C. Após, foram realizadas duas lavagens com água destilada ou água marinha estéril para a retirada do

excesso do meio rico. Os grupos experimentais foram mantidos sob agitação em shaker em 150 rpm por 14 dias a 30°C. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5. Avaliação da produção de biossurfactantes

Para a avaliação da produção de biossurfactantes por cada micro-organismo isolado foram realizadas três diferentes análises: teste de brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), índice de emulsificação e medida de tensão superficial.

3.5.1. Teste de CTAB

Para a seleção dos micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes do tipo ramnolípidios, foi realizada a análise pelo teste de CTAB, com base no método de Bodour e Maier (2002).

Os isolados foram inoculados, com auxílio de uma agulha de platina, em placas de Petri contendo o meio sólido azul de metileno (1% de peptona bacteriológica, 1% de lactose, 0,2% de fosfato de potássio dibásico, 0,0065% de azul de metileno, 1% de CTAB e 1,5% de ágar), adaptado de Siegmund e Wagner (1991). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 7 dias. O resultado foi observado nos tempos de 48, 96 e 168 h. Foi considerada a formação de halo ao redor das colônias como indicativo de resultado positivo para a produção deste tipo de biossurfactante. Foram realizadas triplicatas biológicas para cada isolado testado.

3.5.2. Índice de emulsificação

A medida do percentual do índice de emulsificação em 24 h (IE_{24h}%) foi realizada com base em Cooper e Goldenberg (1987), para verificar a formação de emulsões pelos biossurfactantes de alto peso molecular produzidos pelos micro-organismos. Os isolados foram previamente inoculados em meio rico em nutrientes, LB para as bactérias e GYMP para as leveduras e incubados por 24 h a 30°C. Duas lavagens com água destilada estéril para a retirada do excesso do meio rico foram realizadas antes do ensaio. A verificação do índice de emulsificação foi realizada em amostras com ausência de células (retiradas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min) e em amostras com presença de células microbianas (alíquotas não submetidas à centrifugação).

O índice de emulsificação foi determinado pela adição de 2 mL do meio de cultura, misturados a 2 mL de óleo mineral (derivado de petróleo) em tubos de ensaio com fundo chato, sendo a mistura agitada em vórtex por 2 min e os frascos deixados em repouso por 24 h à temperatura ambiente. Após esse período, o IE_{24h}% foi calculado através da Equação 01. Para todos os isolados foram realizadas triplicatas biológicas.

$$\text{IE}_{24\text{h}}\% = (\text{altura da camada de emulsão/altura total}) \times 100. \quad [01]$$

3.5.3. Tensão superficial

As análises para determinar a tensão superficial (TS) foram realizadas em um medidor de TS digital (Gibertini, Itália) pelo método da placa de Wilhelmy. Para a calibração do equipamento, foram utilizados água destilada (72 mN/m) e etanol 98% (22,5

mN/m) como padrões. Os isolados foram previamente inoculados em meio rico em nutrientes, LB para as bactérias e GYMP para as leveduras, e incubados por 24 h a 30°C. Duas lavagens com água destilada estéril para a retirada de excessos do meio rico foram realizadas antes do ensaio. Cada uma das análises de TS foram feitas com aproximadamente 10 mL do meio de cultura na ausência de células microbianas (removidas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min), conforme item 3.5. Foram realizados testes de TS nos tempos 1, 7 e 14 dias após os tratamentos de remediação na ausência de células microbianas. Todas as amostras foram realizadas triplicatas. As análises foram realizadas no Laboratório de Biorremediação da Faculdade de Agronomia da UFRGS de Porto Alegre/RS.

3.6. Determinação de pH

Para avaliar a natureza dos metabólitos (ácidos ou básicos) oriundos da biodegradação dos hidrocarbonetos durante o crescimento microbiano, foi realizado o monitoramento do pH do sobrenadante (após centrifugação das células a 9000 rpm por 10 min) com o auxílio de um eletrodo de pH acoplado a um pHmetro da marca Digimed DM-22, calibrado com soluções tampão de referência com pH de 4,0, 7,0 e 10,0. O pH foi medido nos tempos de 1, 7 e 14 dias de cada tratamento de biorremediação (item 3.5).

3.7. Viabilidade celular

Para análise da viabilidade celular foi realizada a Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após os 14 dias de tratamento com bioaugmentação e/ou bioestimulação (item 3.5). As células dos micro-organismos selecionados foram

recuperadas e cultivadas nos meios de cultura LB para bactérias e GYMP para leveduras, e então incubadas em estufa a 30°C por até 48h para contagem de colônias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.8. Identificação molecular

Os micro-organismos que obtiveram melhores resultados nos testes preliminares foram identificados utilizando técnicas moleculares.

3.8.1. Extração do DNA genômico das bactérias

O procedimento de extração do ácido desossirribonucléico (DNA) foi realizado segundo o método de Sambrook *et al.* (2001). Os isolados bacterianos foram cultivados em 50 mL de meio LB líquido, incubados *overnight* com agitação de 200 rpm a 30°C. As células microbianas foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 450 µL de tampão de extração TE 1X (100 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8 e 25% de SDS) para a lise química e 50 µl de solução lisozima (5 mg/mL lisozima, 10 mM de Tris-HCl pH 8) para a lise enzimática. Esta mistura foi agitada vigorosamente até ocorrer alteração de viscosidade. As amostras foram incubadas por 15 min a 60°C e posteriormente por 10 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 120 µL de 7,5 M de acetato de amônia a cada amostra, seguido de incubação no gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas à 12000 rpm por 3 min e o sobrenadante foi coletado. Foi adicionado 1 volume de fenol, e realizada centrifugação por 3 min a 12000 rpm e o sobrenadante foi extraído novamente e este passo foi repetido. Foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1), seguido de

centrifugação por 3 min à 12000 rpm, e ao final o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Para a precipitação dos ácidos nucleicos foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M. As amostras foram incubadas *overnight* a -20 °C e após foram centrifugadas por 20 min a 9000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento da centrifugação foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 50 µL de água milli-Q estéril. Por fim, um tratamento com RNase (50 µg/mL) foi realizado por 30 min a 37°C.

A verificação da integridade do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, e as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.8.2. Extração do DNA genômico das leveduras

Os isolados leveduriformes foram cultivados em 50 mL de meio GYMP líquido, incubados *overnight* em 200 rpm a 30°C. As células microbianas foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. O sobrenadante da centrifugação foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 400 µL de tampão de lise 1X (0,15M de NaCl, 10mM EDTA pH8, 50 mM Tris-HCl pH 8, 2% de SDS). As amostras foram incubadas por 60 min a 65°C, sendo homogeneizadas a cada 10 min para evitar a precipitação das células. Após esse período, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1) a cada amostra, seguido de agitação por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Neste sobrenadante foi adicionado 1 volume de clorofórmio, seguido de agitação por 5 min e centrifugação a 12000 rpm por 5 min para a retirada de eventuais impurezas. Foi adicionado 1 mL de isopropanol, e o tubo foi agitado suavemente por 5 min, centrifugado a 12000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi

descartado. O sedimento da centrifugação foi lavado com etanol 70%, ressuspendido e centrifugado por 5 min a 12000 rpm. As amostras foram ressuspendidas em 50 µL de água milli-Q. Por fim, um tratamento com RNase (50 µg/mL) foi realizado por 30 min a 37°C (Sambrook *et al.*, 2001).

A verificação da integridade do DNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, e as amostras foram guardadas a -20°C.

3.8.3. Amplificação de DNA ribossomal

O fragmento correspondente à região 16S do DNA ribossomal foi amplificado por PCR com os iniciadores F27 e R1492 (Apêndice A2). A reação de PCR foi realizada com os seguintes componentes: DNA genômico (50 ng/µL), 2,5 µl de dNTP (1 mM), 1 µL de iniciador (F27 e R1492; 10 pmol/µL), 2,5 µl de tampão 10X (10 mM tris-HCl pH8, 50 mM KCl), 1 µL MgCl₂ (50 mM) e 0,1 µL de Taq DNA polimerase (1 U/µL) (Invitrogen). O volume final da reação foi de 25 µL. O programa para amplificação utilizado possuiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos (94°C por 1 min, 54°C por 30 s, 72°C por 2 min) e 72°C de extensão final por 6 min.

O fragmento correspondente à região 26S do DNA ribossomal no domínio D1/D2 foi amplificado por PCR com os iniciadores NL1 e NL4 (Apêndice A3). A reação de PCR foi realizada com os seguintes componentes: DNA genômico (50 ng/µL), 2,5 µL de dNTP (1 mM), 1 µL de iniciador (NL1 e NL4; 10 pmol/µL), 2,5 µL de tampão 10X (10 mM tris-HCl pH8, 50 mM KCl), 1 µL MgCl₂ (50 mM) e 0,1 µL de Taq DNA polimerase (1 U/µL) (Invitrogen). O volume final da reação foi de 25 µL. O programa para amplificação utilizado possuiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de

35 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min) e 72°C de extensão final por 10 min.

A verificação da integridade dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.8.4. Sequenciamento de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados a partir de gel de agarose utilizando o Kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas em tubos específicos, concentradas à vácuo (Concentrator Plus – Eppendorf) e estocadas a -20°C até a realização do sequenciamento. A quantificação de DNA foi realizada por análise fluorométrica utilizando o fluorômetro Qubit (Invitrogen) e o kit de quantificação de DNA Quant-iT, seguindo as instruções do fabricante.

Aproximadamente 200 ng de DNA genômico foram utilizados para a reação de sequenciamento na plataforma MEGABACE 1000. O volume final para cada reação foi de 10 µL, contendo 1 µL de DNA, 4 µL de água milli-Q e 5 µL do MIX composto por 4 µL do Kit DYE namic ET DYE Terminator Cycle sequencing (Mega BACE) e 1µl de primer (5 pmol/µL). O programa utilizado possui as seguintes condições: 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 20 s e extensão a 60°C por 90 s).

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Sequenciamento de DNA do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.8.5. Alinhamento das sequências nucleotídicas

As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas, utilizando o programa ChromasPro 1.5 e comparadas com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência obtidas EMBL/GenBank database, usando NCBI BLAST.

3.9. Seleção do consórcio microbiano

A partir dos resultados obtidos através da avaliação preliminar de micro-organismos degradadores e dos isolados capazes de produzir biossurfactantes, foram selecionados quatro micro-organismos que obtiveram melhor desempenho para compor o consórcio microbiano, sendo este constituído por duas bactérias e por suas leveduras. Buscou-se, compor consórcios microbianos a partir de isolados com potencialidades metabólicas diversas, capazes de degradar hidrocarbonetos de diferentes composições. Para isto, foram adicionados 10^6 células/mL de cada micro-organismo selecionado em meio de cultivo composto por água marinha e 2% de petróleo, com volume total de 500 mL. Este sistema de bioaugmentação foi incubado por 40 dias a 30°C em agitação de 180 rpm. Também foram realizados controles negativos, cuja única diferença foi a ausência da adição de células microbianas. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.10. Análise cromatográfica

A análise de cromatografia gasosa foi realizada com o objetivo de avaliar a porcentagem de degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio microbiano selecionado. A

preparação das amostras e a quantificação das frações de hidrocarbonetos foram realizadas pela empresa Bioagri – A Mérieux Nutri Sciences Company, de São Paulo-SP.

A preparação da amostra consistiu em separar o óleo adicionado no início do experimento da fase aquosa com o auxílio de um funil de separação. Para isso, foram colocados neste funil 500 mL de cada amostra, o solvente diclorometano e os controles de qualidade. A fração orgânica foi recolhida em um balão de fundo chato. O processo de adição do solvente foi repetido para total remoção dos compostos das amostras. Ao final dessa etapa toda a fase orgânica foi recolhida, filtrada em sulfato de sódio e concentrada proporcionalmente ao volume inicial da amostra. Com o extrato pronto, foi injetado 1 μ L de amostra em GC-FID com as seguintes condições: “Oven” 50°C por 0,5 min, com rampa de 50°C/min até 350°C e mantém por 3,5 min; “Inlet”: 270°C com “Split” de 12 mL/min; “Carrier”: 1 mL/min; Detector: FID a 270°C; Coluna Cromatográfica: DB-5MS 20m x 0,18mm x 0,18 μ m.

Esta metodologia seguiu as referências normativas: USEPA 8015D “*Non halogenated organic susing GC/FID e USEPA 3510C Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction*”.

3.11. Análise estatística

Os dados foram interpretados a partir da análise da variância (ANOVA), com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para comparar as médias entre os tratamentos e os controles negativos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico “Prism” 5.0 (GraphPad, San Diego CA, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento dos micro-organismos

Para a obtenção de micro-organismos resistentes e com possível capacidade de degradação de hidrocarbonetos, foi realizado o isolamento utilizando a técnica de enriquecimento seletivo para as amostras ambientais de solo previamente contaminadas com uma alta concentração de petróleo bruto na proporção de 1:20 (m/m) solo:petróleo, as quais, foram incubadas com agitação por 7 dias. Os diferentes morfotipos cultiváveis em meio sólido podem ser observados na Figura 9 A e B.

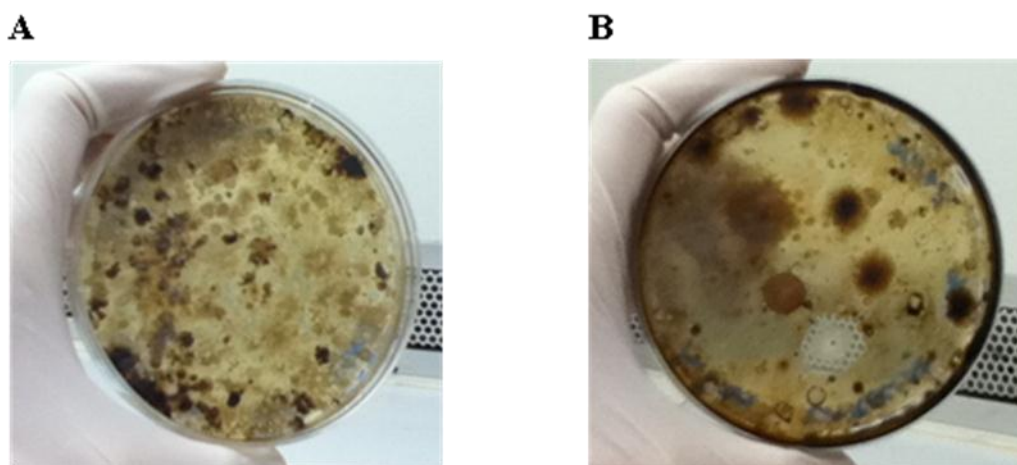


Figura 9: Isolamento dos micro-organismos cultivados em meio (A) LB e (B) BDA.

Em ambientes contaminados com poluentes, a maior parte da microbiota adquire resistência aos contaminantes devido à pressão natural ocasionada por exposições de curtos ou longos períodos de tempo e também por aplicações sucessivas (Atlas, 1981). Estes micro-organismos são capazes de utilizar o poluente como fonte de carbono e energia para

o seu metabolismo, bem como desenvolvem o conjunto enzimático necessário para a degradação destes contaminantes (Colla *et al.*, 2014; Das e Chandran, 2011; Leahy e Colwell, 1990; Zhu *et al.*, 2001).

Neste contexto, a seleção inicial realizada utilizando a técnica de enriquecimento seletivo possibilitou o isolamento de 15 bactérias, três fungos leveduriformes e um fungo filamentoso, totalizando 19 isolados, indicados na Tabela 4. A nomenclatura utilizada para identificar os isolados, seguiu os padrões de identificação da empresa Bioplus Biotecnologia Aplicada Ltda.

Tabela 4: Micro-organismos isolados de meio contaminado com petróleo.

Amostra	Microrganismo isolado
1	BPH 1.1
2	BPH 1.2
3	BPH 1.3
4	BPH 1.4
5	BPH 1.5
6	BPH 1.6
7	BPH 1.7
8	BPH 1.8
9	BPH 1.9
10	BPH 1.10
11	BPH 1.11
12	BPH 1.12
13	BPH 1.13
14	BPH 1.14
15	BPH 1.15
16	BPH 2.1
17	BPH 2.2
18	BPH 2.3
19	BPH 3.1

BP = Bioplus, H = coleção de micro-organismos para remediação de hidrocarbonetos, 1 = bactérias, 2 = leveduras, 3 = fungos filamentosos.

Desta forma, foi possível demonstrar o isolamento de micro-organismos a partir de ambientes contendo altos níveis de contaminação por petróleo e que uma grande

diversidade microbiana é capaz de se desenvolver nestas condições. Estes resultados demonstrados na Figura 9 A e B, assim como na Tabela 4, corroboram com os resultados obtidos em outros estudos como os de Colla *et al.*, (2014), Das e Chandran, (2011), Hughes *et al.*, (2007), Leahy e Colwell, (1990) e Zhu *et al.*, (2001).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm relatado a participação de micro-organismos na metabolização e degradação de hidrocarbonetos do petróleo (Atlas, 1995; Das e Chandran, 2011; Leahy e Colwell, 1990; Xu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2001). As contribuições de bactérias e fungos na degradação de hidrocarbonetos vêm sendo descritas desde a década de 1940, destacando a clássica revisão de literatura realizada por Zobell (1946), onde são listados cerca de 30 gêneros diferentes de micro-organismos com potencial de degradação destes componentes. Inúmeros outros trabalhos foram realizados ao longo dos anos, dentre eles, pode-se citar o estudo realizado por Atlas (1981), que demonstra a investigação e o isolamento de diversas comunidades microbianas a partir de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, onde gêneros de bactérias e leveduras aparecem como os degradadores de hidrocarbonetos predominantes em ecossistemas aquáticos, por exemplo.

Além disso, no estudo realizado por Chaillan *et al.* (2004) diferentes gêneros de bactérias foram isolados a partir de solos contaminados com petróleo, entre eles: *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* e *Mycobacterium* todos exibindo capacidade de degradação da mistura de hidrocarbonetos. No mesmo estudo os autores conseguiram isolar também fungos de diferentes gêneros, como: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia* e *Pichia*.

Como nosso maior interesse era utilizar consórcios microbianos compostos especificamente por bactérias e leveduras, o isolado BPH 3.1 caracterizado como um fungo filamentoso não foi incluído nos experimentos seguintes deste trabalho.

4.2. Seleção preliminar de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos

4.2.1. Indicador redox TTC

Tendo em vista o grande problema das contaminações ambientais por hidrocarbonetos, torna-se interessante selecionar micro-organismos que sejam capazes de metabolizar estes compostos, visando a sua futura aplicação em processos de biorremediação. A metodologia utilizando o indicador redox TTC baseia-se na expressão da atividade metabólica do micro-organismo através da utilização e degradação do contaminante como fonte de carbono e energia, onde este indicador torna-se aceptor artificial de elétrons, substituindo o oxigênio, que é necessário para a metabolização aeróbica dos compostos (Braddock e Catterall, 1999; Richard e Vogel, 1999).

Desta forma, o próximo objetivo foi determinar a capacidade dos micro-organismos previamente isolados em degradar hidrocarbonetos do petróleo, utilizando primeiramente a técnica de utilização do indicador-redox TTC. Os experimentos foram realizados durante o período de 48, 96 e 168 h. Dos 18 micro-organismos isolados no item 4.1, seis isolados foram selecionados neste teste prévio, os quais modificaram rapidamente a coloração do meio mineral, como demonstrado na Tabela 5 e Figura 10.

Tabela 5: Micro-organismos selecionados como potenciais degradadores de petróleo.

Isolado	Indicador Redox - TTC		
	Tempo		
	48h	96h	168h
C N	-	-	-
BPH 1.4			+
BPH 1.5		+	+
BPH 1.14		+	+
BPH 2.1	+	+	+
BPH 2.2	+	+	+
BPH 2.3	+	+	+

+ indica início da mudança de coloração do meio MM1

O TTC, substância incolor, quando em contato com um micro-organismo capaz de utilizar o óleo como principal fonte de carbono e de energia, reage, reduzindo-se a trifetilformazan (TPF), de coloração rosácea (Casida, 1977). Desta maneira, os isolados mostraram eficiência quanto à utilização da fonte de carbono empregada (petróleo). Cada isolado mostrou comportamento variado quanto à mudança de intensidade da cor do meio com indicador em função do tempo, o que evidenciou capacidades diferentes de degradação entre os micro-organismos estudados, sendo a maior parte utilizada nos períodos iniciais.

Dentre os isolados, a bactéria BPH 1.4 demonstrou ter menor capacidade de oxidar a fonte de carbono utilizada nos tempos iniciais, oxidando somente após 168 h de incubação. As bactérias BPH 1.5 e BPH 1.14, quando comparados com os demais, demonstraram possuir um potencial intermediário, pois iniciaram a biodegradação após 96 h de incubação em contato com o petróleo. Os melhores resultados de potencial de degradação do petróleo foram com as leveduras BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3 que iniciaram a biodegradação a partir de 48 h de inoculação.

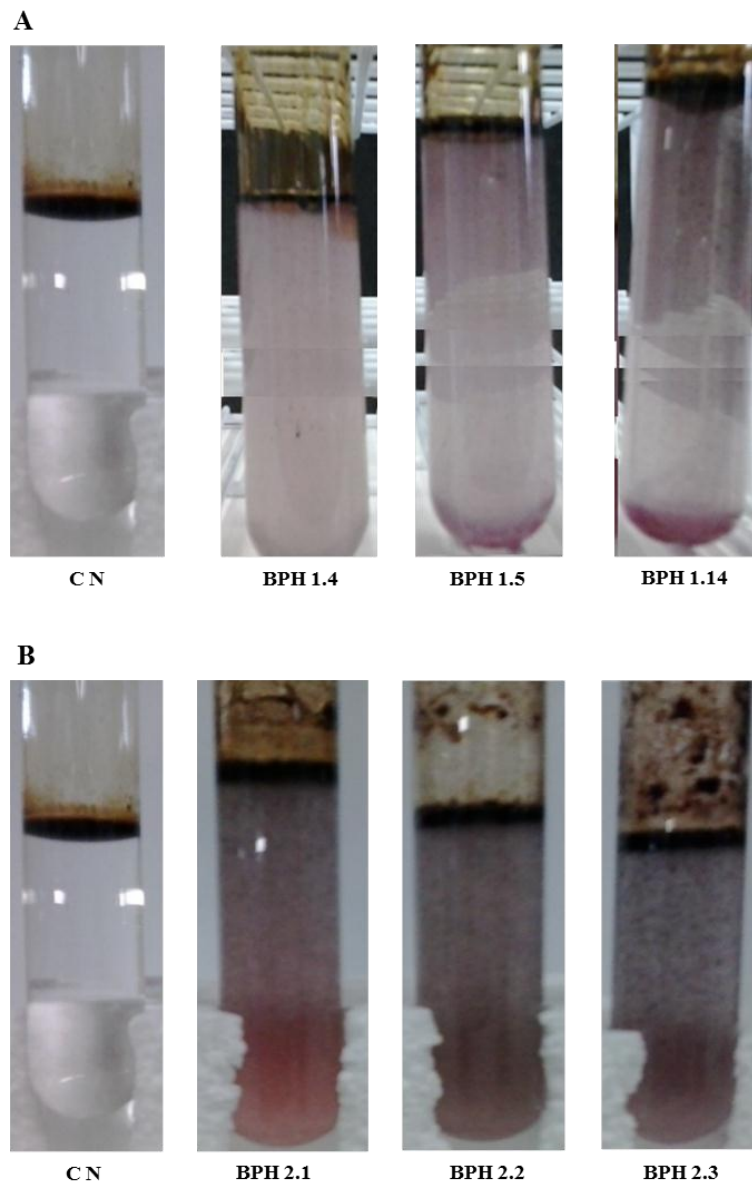


Figura 10: Micro-organismos positivos para indicador redox TTC. (A) bactérias, (B) leveduras. C N = controle negativo (sem adição de células microbianas).

Dessa forma, com os resultados obtidos a partir dos experimentos com TTC, podemos afirmar que os seis micro-organismos selecionados exibiram capacidade biodegradativa, oxidando a fonte de carbono proveniente do petróleo utilizada como substrato.

Como já mencionado, a utilização do TTC como carreador artificial de elétrons durante o metabolismo de micro-organismos tem se mostrado uma maneira bastante eficiente e amplamente utilizada para a triagem e caracterização de possíveis isolados com capacidade de degradar óleos, sendo um método simples, relativamente rápido e de baixo custo, além de possuir uma elevada aptidão para competir com outros transportadores de elétrons da cadeia respiratória. Este indicador ainda atua como um relevante sinalizador de enzimas intracelulares, como as desidrogenases, que tem a capacidade de catalisar reações de oxirredução de compostos orgânicos e apresentam elevada afinidade por transportadores de elétrons (Olga *et al.*, 2008).

Diversos autores vêm utilizando este teste rápido para predizer micro-organismos degradadores de óleos. Klüber e colaboradores (1995), encontraram bactérias capazes de oxidar hidrocarbonetos isolados de solo, entre estas cerca de 90% mostraram habilidade de reduzir o indicador-redox TTC.

Cerqueira e colaboradores (2012), utilizaram em seu estudo 45 bactérias isoladas de amostras contaminadas com resíduos petroquímicos, e em uma análise preliminar de degradação destes resíduos, realizada através do indicador redox TTC, a grande maioria dos isolados mostraram ter capacidade de degradar hidrocarbonetos entre 18 e 48 h, o que difere dos nossos resultados com relação aos tempos, já que conforme observado na Tabela 5, as bactérias isoladas no presente estudo iniciaram a mudança de coloração apenas com 96 h de incubação.

4.2.2. Avaliação preliminar visual da degradação de hidrocarbonetos

Os isolados que demonstraram melhor desempenho no teste do indicador-redox TTC, foram posteriormente submetidos a um teste rápido em placa, para que fosse possível observar visualmente o seu potencial de degradação. Tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação são utilizados como estratégias de remediação de ambientes contaminados (Bento *et al.*, 2005; Boopathy, 2000), dessa forma, em nosso trabalho avaliamos o comportamento dos micro-organismos selecionados nestes diferentes tratamentos. Para isto, os micro-organismos foram inoculados em seis diferentes meios de cultura contendo petróleo, como descrito no item 3.3.2 e após o período de 7 dias de incubação a 30°C foi realizada uma análise visual da degradação e da solubilização do petróleo (Figura 11).

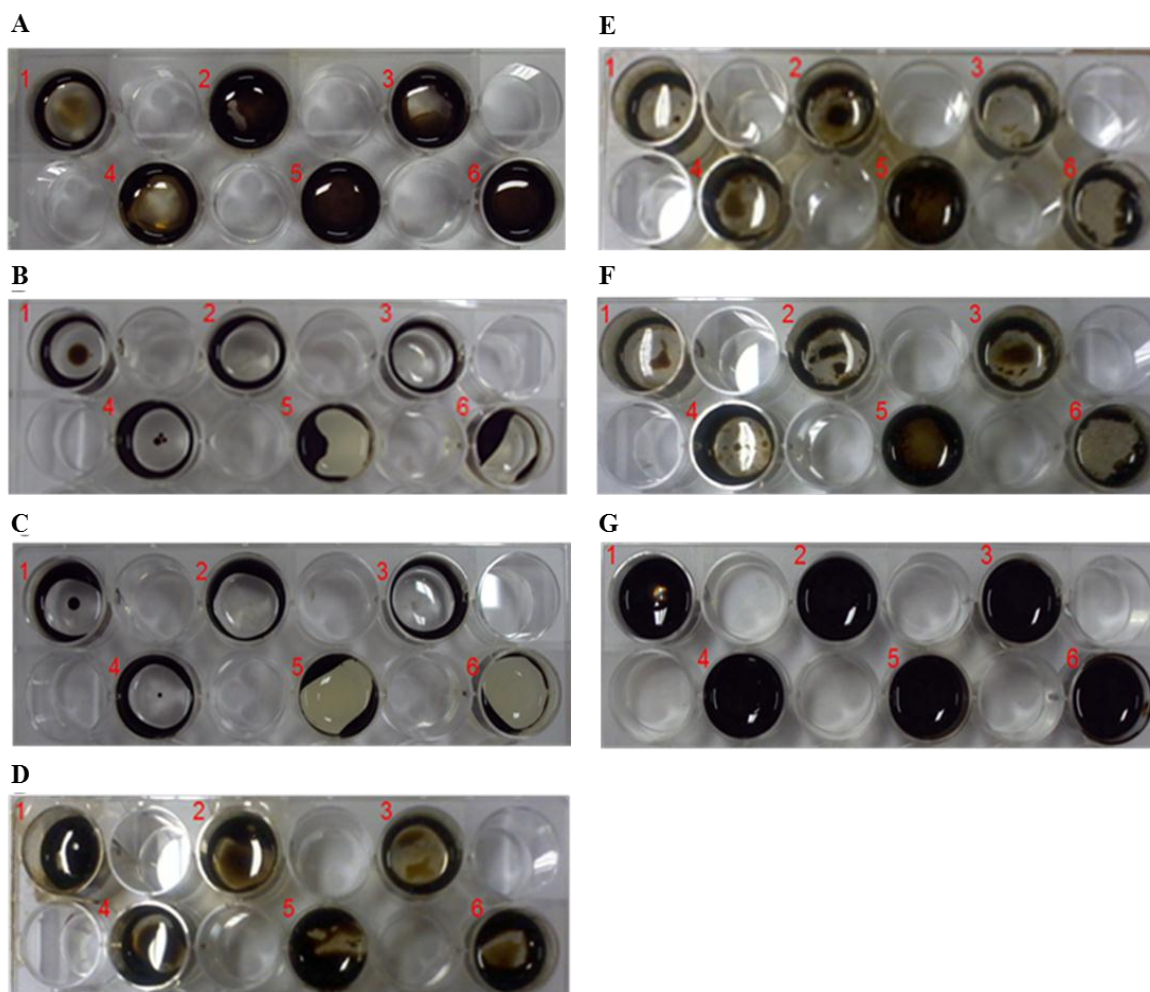


Figura 11: Teste prévio para análise visual do potencial degradador de petróleo dos micro-organismos selecionados, mostrando que os isolados (A) BPH 1.14, (B) BPH 1.4, (C) BPH 1.5, (D) BPH 2.1, (E) BPH 2.2 e (F) BPH 2.3 são capazes de modificar meio contendo 2% de petróleo. (G) Controle Negativo: sem adição de células microbianas. 1. Água destilada; 2. Água marinha; 3. Água marinha com nutrientes; 4. Água destilada com nutrientes; 5. Meio mínimo; 6. Meio mínimo salino.

A partir deste método, foi possível observar uma significativa diminuição na mancha de petróleo quando os diferentes micro-organismos foram adicionados aos meios de cultivo utilizados na análise, corroborando com os resultados obtidos no teste prévio com o indicador redox TTC, no qual todos os micro-organismos se mostraram capazes de utilizar a fonte de carbono empregada, confirmando a possível degradação dos hidrocarbonetos.

Cada micro-organismo respondeu de forma distinta em relação aos diferentes meios de cultura, sendo mais visível a solubilização nos meios contendo: 1- Água destilada, 2- Água marinha, 3- Água marinha com nutrientes e 4- Água destilada com nutrientes. Desta forma, o meio mínimo e o meio mínimo salino, foram excluídos dos demais testes, já que nestes meios a solubilização em geral não foi satisfatória. Estes dois últimos meios foram utilizados com a finalidade de oferecer meios com quantidade nutritiva maior que as duas águas utilizadas.

Com relação ao isolado BPH 1.14 (Figura 11 A), notou-se uma maior alteração na dispersão do óleo nos meios contendo água destilada e água destilada com suplementação de nutrientes. Quando inoculado em água marinha com nutrientes houve uma redução discreta da gota de petróleo. Os demais meios utilizados permaneceram praticamente inalterados nesta primeira análise visual para este micro-organismo, o que sugere uma melhor ação deste micro-organismo em água doce e com tratamentos de bioestimulação.

Para os isolados BPH 1.4 e BPH 1.5 (Figura 11 B e C), os resultados encontrados após os 7 dias de incubação mostraram uma significativa diminuição da mancha de petróleo em todos os meios analisados, o que demonstra que estes micro-organismos isolados podem ter a capacidade de degradação dos hidrocarbonetos do petróleo mais expressiva.

Entre os micro-organismos leveduriformes, o BPH 2.1 (Figura 11 D) demonstrou maior capacidade de reduzir a gota de petróleo nos meios contendo água marinha e água marinha com adição de nutrientes, para os demais meios houve uma alteração menos acentuada. Isto sugere uma maior ação degradadora destes micro-organismos em ambientes salinos. Os isolados BPH 2.2 e BPH 2.3 (Figura 11 E e F), demonstraram perfis

semelhantes quanto a dispersão e solubilização do óleo, sendo estas evidentes em todos os meios com exceção do meio mínimo.

Adicionalmente, quando comparados ao controle negativo (Figura 11 G) é possível sugerir que todos os seis micro-organismos selecionados, apresentam uma habilidade de degradar de alguma forma os hidrocarbonetos presentes na mancha de petróleo, causando uma visível solubilização e diminuição destes nos meios utilizados. Também podemos sugerir que estes micro-organismos apresentam diferentes capacidades de degradação, devido à presença de um padrão de comportamento distinto frente a cada meio de cultivo empregado. Portanto, é possível inferir que tais micro-organismos podem ser utilizados em pesquisas envolvendo tanto processos de bioaugmentação com bioestimulação quanto em apenas processos de bioaugmentação.

4.3. Avaliação da produção de biosurfactantes

Os biosurfactantes são substâncias que aumentam a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos na fase aquosa para os micro-organismos, potencializando sua taxa de biodegradação, sendo, portanto, considerados como coadjuvantes na degradação de óleos pesados (Rahman e Gakpe, 2008; Whang *et al.*, 2008). Dessa forma, com o intuito de selecionar micro-organismos para utilização na biorremediação, a produção de biosurfactantes foi avaliada nos seis micro-organismos previamente selecionados.

4.3.1. Produção de ramnolipídeos pelos micro-organismos

Inicialmente, foi analisada a capacidade de produção de ramnolipídeos dos seis micro-organismos pré-selecionados. Esta técnica foi originalmente desenvolvida para

selecionar ramnolípídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, mas pode ser utilizada para selecionar qualquer biossurfactante aniônico de baixo peso molecular (Bodour e Maier, 2002; Jarvis e Johnson, 1949).

Nossos resultados mostraram que três dos seis isolados apresentaram halo indicativo de produção de biossurfactante em até 168 h de incubação (Tabela 6).

Tabela 6: Micro-organismos capazes de produzir ramnolípídios

Isolado	Ramnolípídios		
	Tempo		
	48h	96h	168h
BPH 1.4		+	+
BPH 1.5	+	+	+
BPH 1.14			
BPH 2.1			
BPH 2.2		+	+
BPH 2.3			

+ indica formação de halo.

Conforme demonstrado na Tabela 6, os isolados que apresentaram a habilidade de produzir biossurfactantes do tipo ramnolípídios foram: BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 2.2.

Conforme citado anteriormente, um dos maiores problemas que os micro-organismos enfrentam na metabolização de hidrocarbonetos é o fato de ter que tornar a fonte de carbono que é hidrofóbica, acessível à célula (Hommel, 1990). Os ramnolípídios são biossurfactantes glicolipídicos de baixo peso molecular, compostos por ramnose e ácidos graxos β -hidroxi, frequentemente observados em micro-organismos degradadores de petróleo, sendo os biossurfactantes mais intensivamente estudados (Chrzanowski *et al.*, 2012; Déziel *et al.*, 1999), principalmente, por exibirem uma elevada atividade superficial

e serem produzidos em um alto rendimento em intervalos de tempos relativamente curtos (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Cameotra e Singh, 2009).

Os ramnolipídeos vêm ganhando crescente popularidade na biorremediação de hidrocarbonetos por serem uma alternativa ambientalmente interessante apresentando maior eficiência que os surfactantes sintéticos, devido as suas características físico-químicas, sua considerável menor toxicidade (Chrzanowski *et al.*, 2012) e também por possuírem a capacidade de serem produzidos de forma renovável por uma grande variedade de micro-organismos (Nitschke *et al.*, 2005). Sua habilidade de formar emulsões e solubilizar componentes imiscíveis na água os torna adequados para várias aplicações industriais e biotecnológicas (Costa *et al.*, 2010). Portanto, eles vêm sendo utilizados em diversos processos, como por exemplo, na biorremediação de contaminantes hidrofóbicos *ex situ*, como agentes de lavagem para solos contaminados, bem como na remediação de derramamentos de óleos em ambientes aquáticos e terrestres (Maier e Soberon-Chavez, 2000). Assim, a grande maioria dos estudos relacionados aos ramnolipídeos possui como principal foco avaliar seus efeitos na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Makkar e Rockne, 2003; Whang *et al.*, 2008), já que alguns autores como, por exemplo, Al-Tahhan e colaboradores (2000), apontam que estes biossurfactantes têm características relacionadas com a assimilação de substratos insolúveis, principalmente hidrocarbonetos.

Em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2014), foram isoladas três linhagens de micro-organismos a partir de solo contaminado com óleo bruto, para averiguar a capacidade de produção de biossurfactantes. Os resultados mostraram haver produção dos seguintes biossurfactantes: glicolipídeos (ramnolipídeos mais estudados), fosfolipídeos e lipopeptídeos, como consequência dessa produção, foi detectado um aumento da solubilização e biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo em águas

subterrâneas, e a utilização de um consórcio microbiano foi capaz de aumentar consideravelmente a taxa de degradação.

Por outro lado, Cameotra e Singh (2008) utilizaram em seu estudo um consórcio microbiano contendo dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e um isolado de *Rhodococcus erythropolis*, para a remediação de solo contendo borra oleosa. Além do consórcio foram adicionados ao meio dois aditivos, uma mistura de nutrientes e uma mistura de ramnolipídeos produzidos por outros micro-organismos, que foram avaliados separadamente. O melhor resultado obtido para diminuição da taxa de hidrocarbonetos foi com o uso da mistura de ramnolipídeos que resultou em cerca de 95% de degradação em quatro semanas de tratamento.

Adicionalmente, Rahman *et al.* (2003) avaliaram a taxa de degradação de n-alcenos em resíduos de petróleo depositados no interior de tanques de armazenamento, a partir da utilização de um consórcio microbiano com adição de ramnolipídeos, os resultados obtidos mostraram efeitos positivos na biorremediação destes hidrocarbonetos.

Dessa forma, podemos dizer que a técnica de produção de biossurfactantes, mais especificamente de ramnolipídeos, é amplamente utilizada para verificar a eficiência de alguns micro-organismos em degradar hidrocarbonetos de petróleo. No nosso caso, os isolados que se destacaram com relação à produção de ramnolipídeos foram os identificados como BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 2.2, ou seja, duas bactérias e uma levedura, portanto, estes micro-organismos mostram-se mais promissores para utilização na remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

4.3.2. Determinação do índice de emulsificação

A fim de avaliar a produção de biossurfactantes de alto peso molecular pelos micro-organismos selecionados, utilizamos a medida do Índice de Emulsificação (IE_{24h}%). Bioemulsificantes podem ser produzidos como uma estratégia de adaptação dos micro-organismos à presença de contaminantes, e tem a capacidade de aumentar a área de contato entre a fonte de carbono e a célula microbiana, que através de modificações na superfície celular, possibilitam atuar sobre os hidrocarbonetos hidrofóbicos aumentando sua disponibilidade ao ataque dos micro-organismos (Chrzanowski *et al.*, 2012; Hommel, 1990).

Desta forma, a determinação de biossurfactantes foi realizada com o intuito de verificar a produção de bioemulsificantes ligados à parede celular dos micro-organismos e também o percentual de bioemulsificantes liberados extracelularmente (sobrenadante, na ausência de células). Nas Figuras 12 e 13 podemos observar o IE_{24h}% de todos os isolados selecionados.

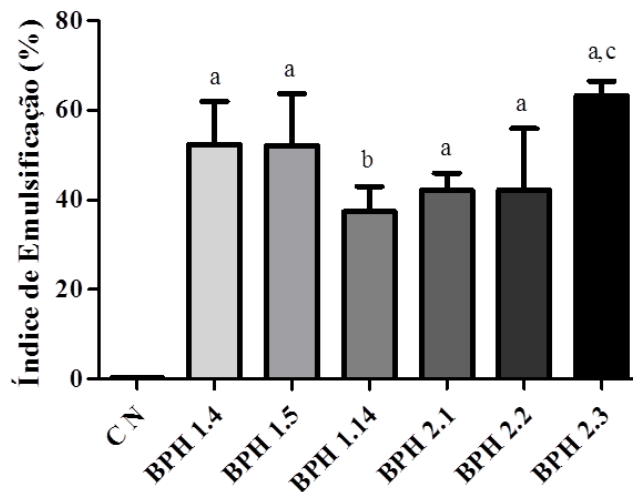


Figura 12: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados em meio de cultivo rico em nutrientes, contendo células. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para as triplicatas. ^a $p < 0,001$ quando comparado ao C N; ^b $p < 0,01$ quando comparado ao C N e ^c $p < 0,05$ quando comparada a BPH1.14 (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey). C N = controle negativo.

Os resultados obtidos para o $IE_{24h}\%$ na presença de células microbianas (Figura 12) para todos os micro-organismos selecionados foram significativamente elevados quando comparados ao controle negativo, sendo que os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3 demonstraram maior diferença estatística ($p < 0,001$). O isolado BPH 1.14 teve uma porcentagem de emulsificação mais discreta em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa na produção de emulsão entre os isolados, com exceção do isolado BPH 2.3 que apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao isolado BPH 1.14.

Como podemos observar o micro-organismo com menor $IE_{24h}\%$ obtido foi o BPH 1.14 com cerca de 38% de emulsificação, sendo que os demais apresentaram $IE_{24h}\% > 40$. O isolado BPH 2.3 se destacou apresentando cerca de 63% de emulsificação, seguido pelos isolados BPH 1.4 e 1.5 com cerca de 52% de emulsificação e BPH 2.1 e BPH 2.2 com aproximadamente 42% de emulsificação. Estes resultados demonstram um elevado nível

de solubilização dos contaminantes ocasionado pela adição de micro-organismos ao meio, sendo possível sugerir a presença de biossurfactantes na parede celular dos isolados.

Ao analisarmos os resultados do $IE_{24h}\%$ dos micro-organismos em relação ao sobrenadante (Figura 13), onde há a ausência de células, também observamos elevados níveis de emulsão, principalmente quando comparado ao controle negativo. Nesta condição novamente os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3 apresentaram um $IE_{24h}\%$ significativamente mais elevado ($p < 0,001$) e o isolado BPH 1.14 apresentou uma menor diferença ($p < 0,01$) quando comparados ao controle negativo.

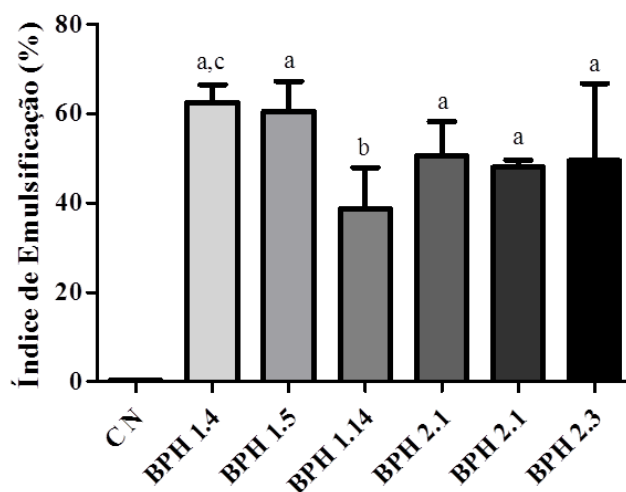


Figura 13: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados em meio de cultivo rico em nutrientes, na ausência de células. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão para as triplicatas. ^a $p < 0,001$ quando comparado ao C N; ^b $p < 0,01$ quando comparado ao C N e ^c $p < 0,05$ quando comparada a BPH1.14 (ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey). C N = controle negativo.

Não houve diferença significativa no $IE_{24h}\%$ entre os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3. Foi encontrada diferença estatística apenas entre os isolados BPH 1.4 quando comparado ao BPH 1.14 ($p < 0,05$). Novamente o micro-organismo BPH

1.14 apareceu com o menor $IE_{24h}\%$ com cerca de 39% de emulsificação, sendo que os demais apresentaram $IE_{24h}\% > 50$.

Nestas condições de análises, dois isolados apareceram com os maiores $IE_{24h}\%$ encontrados, sendo estes as bactérias identificadas como BPH 1.4 e BPH 1.5, que apresentaram 62,5% e 61% de emulsificação, respectivamente, sugerindo uma maior produção de biossurfactantes de alto peso molecular por estes micro-organismos. Os demais isolados permaneceram com um $IE_{24h}\%$ de cerca de 50%. Em um panorama geral o $IE_{24h}\%$ foi elevado tanto nas amostras contendo sobrenadante quanto nas amostras com a presença de células, o que sugere que biossurfactantes de alto peso molecular produzidos, podem estar localizados na parede celular e também estão sendo secretados pelos micro-organismos avaliados.

Os resultados do $IE_{24h}\%$ de cada micro-organismo para amostras de sobrenadante, com ausência de células, são ilustrados na Figura 14 (A e B).

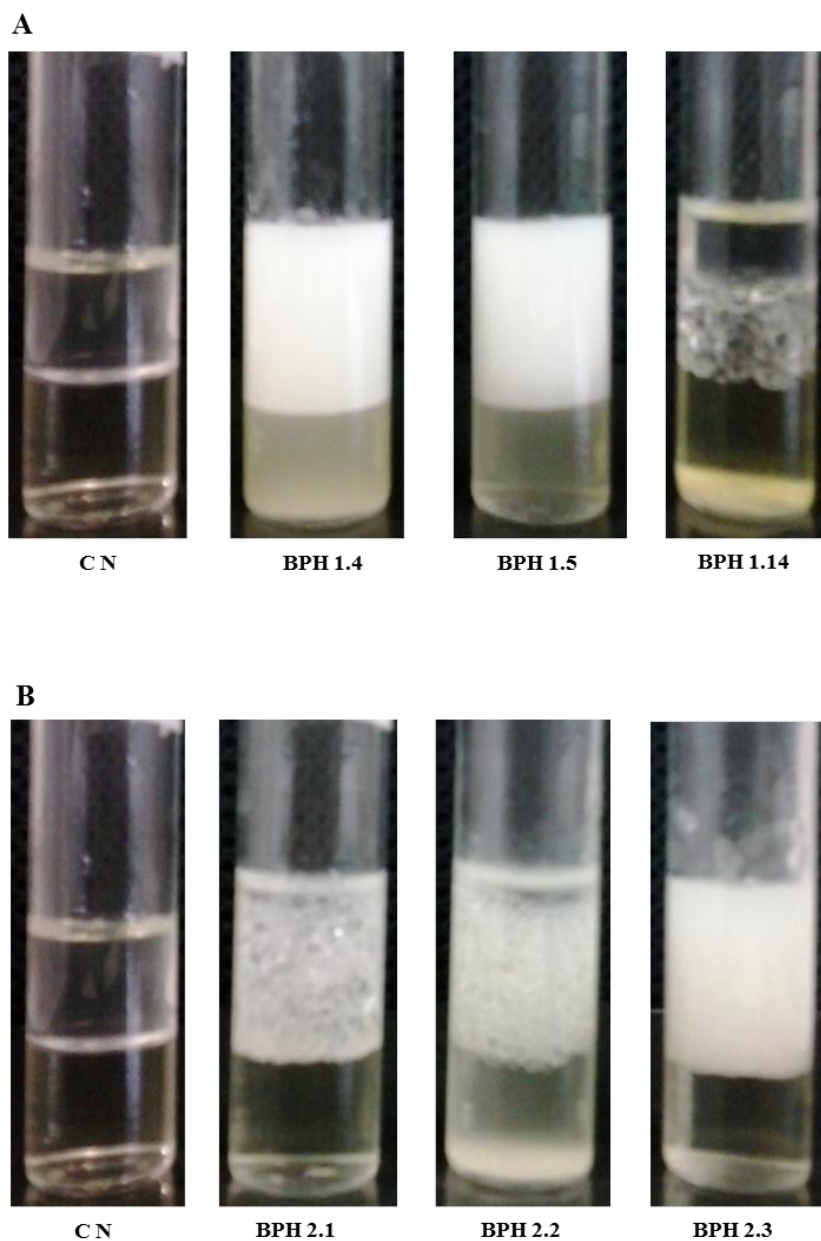


Figura 14: Aspecto da emulsificação da fase oleosa dos seis isolados selecionados, a partir de bioemulsificantes extracelulares. (A) bactérias, (B) leveduras. C N = controle negativo.

Em um estudo realizado por Al-Wahaibi *et al.* (2014), avaliou-se a produção de biossurfactantes através do índice de emulsificação para o *Bacillus* B30, utilizando diferentes fontes de hidrocarbonetos, como: hexadecano, heptano, hexano e óleo bruto. Os resultados encontrados por estes autores demonstraram que em condições livres de células este micro-organismo foi capaz de emulsificar a maioria dos hidrocarbonetos testados.

Observou-se maior emulsificação ($\geq 50\%$) com os hidrocarbonetos de cadeia longa, tais como os presentes no petróleo bruto, que possivelmente, desempenham um papel essencial no aumento da recuperação de óleo.

Noparat e colaboradores (2014), investigaram a produção de biossurfactantes pela bactéria *Sphingobacterium spiritivorum* AS43, para aplicação na degradação de óleo lubrificante. Este micro-organismo quando cultivado em meio contendo compostos hidrofóbicos alcançou IE_{24h}% entre 42 e 66%.

Varadavenkatesan e Murty (2013), isolaram e caracterizaram micro-organismos produtores de biossurfactantes a partir de sítios contaminados com petróleo. Estes autores descrevem, pela primeira vez, a utilização do *Bacillus siamensis* como produtor de surfactantes, com uma taxa de emulsificação variando de 50 a 70% conforme o pH, a temperatura e a salinidade dos meios utilizados.

Yuan *et al.* (2014), em seu estudo avaliaram a capacidade de emulsificação de uma linhagem de *Acinetobacter* para aplicação na degradação de pirenos e os resultados mostraram um índice de 15%.

Como podemos observar a literatura descreve que existe uma grande variação entre as capacidades de emulsificação de diversos micro-organismos já descritos, mas na grande maioria dos casos ocorre um aumento da degradação dos diferentes contaminantes quando estes bioemulsificadores são utilizados. Assim, nossos resultados comprovam a produção de bioemulsificantes pelos micro-organismos testados, tanto extracelularmente quanto ligados à parede celular, o que pode estar auxiliando na utilização dos hidrocarbonetos do petróleo pelos micro-organismos. Bento e colaboradores (2008), relatam que os bioemulsificantes detectados por este método podem ser considerados uma subclasse de surfactantes que tem a habilidade de estabilizar dispersões de um líquido em outro, como

as emulsões de óleo em água. Assim, os micro-organismos selecionados em nosso estudo se tornam bastante promissores na remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.

4.3.3. Medida da tensão superficial (TS)

A TS consiste em outra forma de medir, porém indiretamente a produção de biosurfactantes. A TS de todos os micro-organismos foi medida em três diferentes tempos, no primeiro, sétimo e décimo quarto dias de tratamento, com objetivo de avaliar a produção de biosurfactantes pelos isolados.

Na tabela 7, podemos observar os dados da TS de todos os micro-organismos selecionados, nos tratamentos de bioaugmentação e bioaugmentação juntamente com bioestimulação em meios contendo água destilada.

Tabela 7: Medida de tensão superficial (mN/m) dos isolados nos diferentes tratamentos em água destilada.

	Bioaugmentação			Bioaugmentação + Bioestimulação		
	1 dia	7 dias	14 dias	1 dia	7 dias	14 dias
C N	71,0 ± 1,0	69, ± 1,0	67,8 ± 0,8	71,5 ± 0,5	71,0 ± 0,4	70,8 ± 0,7
BPH 1.4	54,2 ± 2,0 A	64,5 ± 1,3 d	66,8 ± 0,6 a	62,4 ± 2,1 A	60,2 ± 1,2 A	55,7 ± 0,1 Ac
BPH 1.5	54,3 ± 8,3 A	55,4 ± 1,5 A	53,4 ± 2,2 A	61,5 ± 2,2 A	59,4 ± 0,5 A	60,0 ± 3,3 A
BPH 1.14	59,6 ± 1,0 A	62,2 ± 2,1 C	58,8 ± 2,3 A	50,1 ± 1,8 A	67,4 ± 1,4 d	62,1 ± 3,3 Aa
BPH 2.1	66,3 ± 5,9	55,9 ± 1,4 Ad	56,8 ± 2,4 Aa	60,7 ± 6,4 A	46,7 ± 3,8 Ad	43,6 ± 3,0 Aa
BPH 2.2	58,4 ± 1,1 A	55,2 ± 0,7 A	52,6 ± 2,1 A	70,4 ± 1,7	52,3 ± 0,2 Ad	48,2 ± 0,8 Aa
BPH 2.3	58,6 ± 1,5 A	48,2 ± 0,2 Ad	48,2 ± 1,9 Aa	53,5 ± 3,5 A	41,8 ± 0,7 Ad	36,0 ± 0,5 Aai

Letras maiúsculas para comparação de cada isolado com Controle negativo (CN) no respectivo tempo, onde ^A=p<0,001, ^B=p<0,01, ^C=p<0,05. Letras minúsculas para comparação entre os tempos 1 e 14 para cada amostra, onde ^a=p<0,001, ^b=p<0,01, ^c=p<0,05; entre tempos 1 e 7 para cada amostra, onde ^d=p<0,001, ^e=p<0,01, ^f=p<0,05; entre tempos 7 e 14, onde ^g=p<0,001, ^h=p<0,01, ⁱ=p<0,05.

Com relação ao tratamento de bioaugmentação, podemos observar que já no primeiro dia de tratamento houve alterações na TS do meio pelos isolados, sendo estas mais acentuadas no decorrer do tratamento. De forma geral, podemos concluir que houve uma diminuição da TS por praticamente todos os micro-organismos quando comparados ao controle negativo, principalmente no 14º dia de tratamento.

Conforme pode ser observado na Tabela 7, no 1º dia de tratamento os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 1.14, BPH 2.2 e BPH 2.3, mostraram reduzir a TS entre óleo e água significativamente em relação ao controle negativo deste mesmo tempo ($p < 0,001$). No sétimo dia, esse padrão se manteve para os isolados BPH 1.5, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3, porém para o isolado BPH 1.14 a diminuição na TS se mostrou menos acentuada ($p < 0,05$). Os resultados do décimo quarto dia, demonstram uma diminuição bastante significativa na medida de TS por todos os isolados ($p < 0,001$), exceto o BPH 1.4.

Com relação às alterações da TS entre os tempos para cada amostra, podemos concluir que entre os controles negativos não houve diferença significativa durante os 14 dias de incubação. Entre o primeiro e o sétimo dia, houve uma diferença significativa apenas para os isolados BPH 1.4, BPH 2.1 e BPH 2.3 ($p < 0,001$), sendo que o BPH 1.4 curiosamente causou um aumento da TS. Entre o sétimo dia e o décimo quarto dia, não houve diferença significativa das medidas entre todos os isolados. Já entre o primeiro e o décimo quarto dia, podemos observar o mesmo perfil de alteração que ocorreu entre os tempos 1 e 7.

O isolado BPH 2.3, demonstrou o menor valor de TS entre todos os isolados testados, sendo que a partir do sétimo dia de tratamento os valores permaneceram em cerca de 48,2 mN/m. Em seguida, temos o isolado BPH 2.2 e BPH 1.5, com valores de 52,6 mN/m e 53,4 mN/m, respectivamente, no último dia de tratamento. O isolado BPH 2.1

reduziu a TS para 56,8 mN/m até o final do tratamento. Para o isolado BPH 1.14 foi encontrado um valor final de 58,8 mN/m. Curiosamente, o isolado BPH 1.4 exibiu uma medida de TS bastante baixa no primeiro dia, de 54,2 mN/m, que aumentou nos dias seguintes, sendo encontrados valores de 66,8 mN/m no último dia de tratamento. Este resultado sugere que a síntese de biossurfactantes ocorre nos períodos iniciais de tratamento para este micro-organismo.

De acordo com Willumsen e Karlson (1996) um biossurfactante eficiente tem a capacidade de reduzir a medida da TS do meio em até 20 unidades, isto quando comparado a água destilada, o que significa que valores inferiores a 50 mN/m já são considerados satisfatórios. Desta forma, apesar da maioria dos isolados apresentarem medidas de TS menores do que as dos controles negativos para o tratamento de bioaugmentação, apenas o isolado BPH 2.3 demonstrou uma capacidade satisfatória de produção de biossurfactante de baixo peso molecular no tratamento de bioaugmentação em água destilada contaminada com petróleo.

Com relação ao tratamento conjunto de bioaugmentação e bioestimulação, o perfil global das análises foi semelhante ao encontrado para o tratamento apenas com bioaugmentação no qual, todos os isolados foram capazes de reduzir a TS dos meios utilizados.

Como podemos observar já no primeiro dia de tratamento os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 1.14, BPH 2.1 e BPH 2.3, mostraram reduzir significativamente a TS entre óleo e água em relação ao controle negativo deste tempo ($p < 0,001$). No sétimo dia, os isolados BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3, demonstraram a mesma significância na redução da tensão. Os resultados do décimo quarto dia, demonstram uma

diminuição bastante significativa na medida de TS por todos os isolados quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$).

Com relação às alterações da TS entre os tempos por cada amostra, podemos concluir que para os controles negativos não houve diferença significativa durante os 14 dias de incubação. Entre o primeiro e o sétimo dia, houve uma diferença significativa entre os valores apenas para os isolados BPH 1.14, BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3 quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$). Entre o sétimo dia e o décimo quarto dia, não houve diferença significativa das medidas entre todos os isolados, exceto para o isolado BPH 2.3 que desempenhou uma redução ainda maior na tensão entre estes tempos ($p < 0,05$). Já entre o primeiro e o décimo quarto dia, podemos observar que todos os isolados diminuíram os valores de TS significativamente, com exceção do BPH 1.5.

Os isolados leveduriformes obtiveram maior sucesso na redução da TS quando comparados aos isolados bacterianos neste tipo de tratamento. Podemos destacar novamente o isolado BPH 2.3 que apresentou a menor TS em relação ao controle, com 36,0 mN/m, após os 14 dias de tratamento. Os isolados BPH 2.1 e BPH 2.2 apresentaram TS de 43,6 e 48,2 mN/m, respectivamente. Já entre os isolados bacterianos o BPH 1.4 demonstrou um menor valor de TS, de 55,7 mN/m, seguido pelo BPH 1.4, BPH 1.5 com 60 mN/m e BPH 1.14 com 62,1 mN/m.

Em relação aos dois tratamentos, podemos concluir que, de maneira geral, todos os isolados foram capazes de reduzir as medidas de TS, exceto no tratamento de bioaugmentação com o isolado BPH 1.4 onde este não demonstrou diferença significativa quando comparado ao controle negativo.

No entanto, apesar da maioria dos isolados apresentarem medidas de TS menores que as dos controles negativos, apenas os isolados leveduriformes demonstraram uma

capacidade satisfatória de produção de biossurfactante no tratamento de bioaumentação combinado com bioestimulação. Sendo assim, é possível sugerir que a adição de nutrientes, corrobora para a produção de biossurfactantes pelos isolados leveduriformes, e ainda que a elevada produção de bioemulsificantes pelas leveduras e de ramnolipídeos encontrada para os isolados BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 2.2 pode estar influenciando nas reduções da TS.

Na tabela 8, podemos observar os resultados da TS obtidos nos diferentes tratamentos para os seis micro-organismos em meios de cultivo contendo água marinha.

Tabela 8: Medida de tensão superficial (mN/m) dos isolados nos diferentes tratamentos em água marinha.

	Bioaumentação			Bioaumentação + Bioestimulação		
	1 dia	7 dias	14 dias	1 dia	7 dias	14 dias
C N	59,8 ± 0,7	56,0 ± 1,0	52,2 ± 0,7 ^b	67,5 ± 0,5	62,9 ± 0,5	60,3 ± 1,2 ^b
BPH 1.4	50,1 ± 1,1 ^A	55,5 ± 0,3	51,0 ± 3,3	56,2 ± 5,6 ^A	63,4 ± 0,4 ^e	53,3 ± 2,3 ^{Cg}
BPH 1.5	48,5 ± 3,1 ^A	51,4 ± 1,5	51,8 ± 0,4	54,8 ± 0,8 ^A	58,5 ± 1,5	58,7 ± 2,4
BPH 1.14	55,1 ± 0,4	49,6 ± 1,8 ^C	49,3 ± 2,7	48,2 ± 1,4 ^A	57,3 ± 3,2 ^d	56,6 ± 3,9 ^a
BPH 2.1	56,8 ± 6,5	51,0 ± 1,0	54,0 ± 0,7	58,5 ± 2,4 ^A	47,4 ± 0,9 ^{Ad}	45,9 ± 1,7 ^{Aa}
BPH 2.2	51,3 ± 4,7 ^B	48,4 ± 1,8 ^B	53,0 ± 1,8	61,7 ± 3,2	52,5 ± 1,1 ^{Ad}	52,6 ± 1,9 ^{Ab}
BPH 2.3	52,7 ± 2,8 ^C	54,8 ± 5,3	56,5 ± 0,7	51,5 ± 6,0 ^A	44,5 ± 1,9 ^{Ae}	40,1 ± 0,1 ^{Aa}

Letras maiúsculas para comparação de cada isolado com C N no respectivo tempo, onde ^A=p<0,001, ^B=p<0,01, ^C=p<0,05. Letras minúsculas para comparação entre os tempos 1 e 14 para cada amostra, onde ^a=p<0,001, ^b=p<0,01, ^c=p<0,05; entre tempos 1 e 7 para cada amostra, onde ^d=p<0,001, ^e=p<0,01, ^f=p<0,05; entre tempos 7 e 14, onde ^g=p<0,001, ^h=p<0,01, ⁱ=p<0,05.

De acordo com os nossos resultados com relação ao tratamento de bioaumentação, no primeiro dia de tratamento houve uma diminuição na TS pelos isolados BPH 1.4 (p<0,001), BPH 1.5 (p<0,001), BPH 2.2 (p<0,01) e BPH 2.3 (p<0,05) quando comparado ao controle negativo. Quanto ao sétimo dia de tratamento, apenas os isolados BPH 1.14 (p<0,05) e BPH 2.2 (p<0,01) mantiveram a TS significativamente reduzida em relação ao controle negativo deste tempo. Após os 14 dias de tratamento não foram observadas

diferenças significativas entre a TS dos isolados e do controle negativo. Portanto, esses resultados sugerem a presença da ação de biossurfactantes apenas nos períodos iniciais de tratamento. No que diz respeito aos tempos de tratamento de bioaugmentação, houve uma diminuição significativa na TS apenas para o controle negativo, quando comparado o primeiro e o décimo quarto dia de tratamento ($p < 0,01$).

Já para os tratamentos concomitantes de bioaugmentação e bioestimulação, após o período de 14 dias foi possível observar uma diferença na medida de TS, sendo esta mais evidente para os isolados leveduriformes.

No primeiro dia de tratamento, todos os isolados demonstraram reduzir a TS dos meios quando comparados ao controle negativo deste mesmo tempo ($p < 0,001$), exceto o BPH 2.2. Entretanto, no sétimo e décimo quarto dias apenas os isolados leveduriformes (BPH 2.1, BPH 2.2, BPH 2.3) e o BPH 1.4 obtiveram sucesso na redução significativa da tensão entre a interface óleo/água quando comparados aos controles negativos de seus tempos (diferença de $p < 0,001$ e $p < 0,05$). Em relação aos tempos de tratamento para cada amostra, houve diferença significativa entre o primeiro e sétimo dia para todos os isolados exceto para o BPH 1.5. O mesmo ocorreu em relação ao primeiro e décimo quarto dias, sendo que houve também diferença entre os controles negativos ($p < 0,01$). Quando comparadas as medidas entre o sétimo e décimo quarto dia, observamos que apenas o BPH 1.4 apresentou redução significativa na TS ($p < 0,001$).

Dessa forma, observando os dois tratamentos, podemos concluir que houve um melhor desempenho dos micro-organismos na produção de biossurfactantes no tratamento conjunto de bioaugmentação mais bioestimulação. Além disso, os micro-organismos leveduriformes foram mais eficientes.

O isolado BPH 2.3 foi o micro-organismo que reduziu mais significativamente a tensão superficial do meio, alterando de 60,5 para 40,1 mN/m no último dia de tratamento, seguido pelo BPH 2.1 e BPH 2.2, com valores de 45,6 e 52,6 mN/m, respectivamente. Entre as bactérias, o isolado BPH 1.4 obteve melhor resultado, com a medida de TS final de 53,3 mN/m.

Assim, podemos concluir que a medida de TS vai diminuindo gradativamente com o passar do tempo, mesmo para os controles negativos. Sendo que para os meios contendo água destilada esta redução é mais acentuada, tanto em comparação aos controles quanto aos tratamentos em água marinha.

Vale ressaltar que os hidrocarbonetos presentes na mistura de petróleo apresentam características físico-químicas que contribuem para a diminuição da TS, tornando difícil a identificação das alterações que podem ser causadas pela produção de biossurfactantes. Além disso, Makkar e Rockne (2003), relatam que as condições de crescimento e a natureza do meio de cultivo podem influenciar no tipo e na produção dos biossurfactantes.

Sabe-se que geralmente surfactantes de baixo peso molecular são bem conhecidos por reduzirem a TS e a tensão interfacial entre óleo e água e, assim, aumentam a recuperação de óleos (Banat *et al.*, 2010). Essas estruturas conferem uma ampla gama de propriedades, que incluem a habilidade de formar micelas e microemulsões entre as duas diferentes fases (Das e Chandran, 2011; Smyth *et al.*, 2010).

Diversos autores afirmam que a produção de biossurfactantes causa uma queda da tensão superficial em fases aquosas, tornando as emulsões de óleo em água mais estáveis (Cooper e Goldenberg, 1987). Em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, a redução nas medidas da TS é comum, onde certos micro-organismos são induzidos a

produzir agentes tensoativos extracelulares, o que possibilita a formação de microemulsões estáveis, facilitando o transporte e metabolização de hidrocarbonetos.

Em um estudo realizado por Al-Wahaibi e colaboradores (2014), a aplicação de biossurfactantes na recuperação de óleo foi avaliada. Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* foram capazes de reduzir a TS do meio para 26,63 mN/m.

Cameotra e Singh (2009), selecionaram cinco isolados de solo contaminado com petróleo e analisaram a capacidade de redução da TS por estes isolados em meios contendo hexadecano. Todos os micro-organismos selecionados demonstraram diminuir a medida da TS após 14 dias de tratamento, os valores permaneceram entre 30 e 40 mN/m.

Por outro lado, dados obtidos por Rahman *et al.* (2003), onde foi avaliada a medida de TS da comunidade nativa e de um consórcio microbiano em tratamentos de borra oleosa após 84 dias, mostraram reduções menos expressivas da tensão, o que pode indicar que não esteja ocorrendo uma produção muito elevada de biossurfactantes de baixo peso molecular.

Com base em dados da literatura e nos resultados encontrados em nosso estudo, podemos sugerir que existe uma produção significativa de substâncias tensoativas pelos micro-organismos isolados, principalmente os leveduriformes, porém, uma avaliação da TS após um período mais longo de tratamento talvez fosse interessante, para averiguar se o padrão encontrado se mantém.

4.4. Determinação de pH

A fim de investigar a produção de metabólitos de carácter ácido ou básico oriundos da possível atividade de degradação dos hidrocarbonetos foi realizada a medida do pH da fase aquosa dos isolados nos tempos 1, 7 e 14 dias.

As alterações observadas nos tratamento contendo água destilada podem ser observadas na Tabela 9.

Tabela 9: Avaliação de pH da fase aquosa dos micro-organismos nos diferentes tratamentos em água destilada.

	Bioaugmentação			Bioaugmentação + Bioestimulação		
	1 dia	7 dias	14 dias	1 dia	7 dias	14 dias
C N	7,1 ± 0,4	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7	5,0 ± 0,8	5,1 ± 0,7	5,1 ± 0,6
BPH 1.4	6,0 ± 0,4 ^C	5,9 ± 0,6 ^C	6,1 ± 0,7	5,6 ± 0,2	5,0 ± 0,0	5,4 ± 0,0
BPH 1.5	7,3 ± 0,1	5,8 ± 0,3 ^{Bd}	7,0 ± 0,0 ^g	5,6 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,4 ± 0,3
BPH 1.14	7,0 ± 0,3	7,4 ± 0,0	6,9 ± 0,0	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,0
BPH 2.1	6,6 ± 0,1	4,3 ± 0,0 ^{Ad}	4,4 ± 0,3 ^{Aa}	3,1 ± 0,1 ^A	2,7 ± 0,1 ^A	2,9 ± 0,0 ^A
BPH 2.2	5,2 ± 0,3 ^A	4,5 ± 0,0 ^A	4,6 ± 0,5 ^A	3,1 ± 0,0 ^A	2,8 ± 0,2 ^A	2,5 ± 0,1 ^A
BPH 2.3	4,8 ± 0,6 ^A	3,8 ± 0,0 ^{Ae}	4,2 ± 0,0 ^A	2,9 ± 0,0 ^A	2,6 ± 0,1 ^A	2,7 ± 0,2 ^A

Letras maiúsculas para comparação de cada isolado com C N no respectivo tempo, onde ^A=p<0,001, ^B=p<0,01, ^C=p<0,05. Letras minúsculas para comparação entre os tempos 1 e 14 para cada amostra, onde ^a=p<0,001, ^b=p<0,01, ^c=p<0,05; entre tempos 1 e 7 para cada amostra, onde ^d=p<0,001, ^e=p<0,01, ^f=p<0,05; entre tempos 7 e 14, onde ^g=p<0,001, ^h=p<0,01, ⁱ=p<0,05.

De acordo com os resultados do tratamento de bioaugmentação podemos observar que o crescimento e atividade microbiana ocasionou alterações nas medidas de pH para todos os isolados em algum momento do tratamento, sendo esta redução mais significativa para os micro-organismos leveduriformes, após 14 dias de tratamento (p<0,001). No tempo 1 dia, houve redução significativa do pH dos meios pelos isolados BPH 1.4 (p<0,05), BPH 2.2 (p<0,001) e BPH 2.3 (p<0,001), quando comparados ao controle negativo do respectivo tempo. Com relação ao tempo 7 dias houve redução significativa no pH dos

meios pelos isolados BPH 1.4 ($p < 0,05$), BPH 1.5 ($p < 0,01$), BPH 2.1 ($p < 0,001$), BPH 2.2 ($p < 0,001$) e BPH 2.3 ($p < 0,001$) quando comparados ao controle negativo deste mesmo tempo. Já com relação ao tempo 14 dias apenas os isolados leveduriformes (BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3) reduziram significativamente o pH do meio quando comparados ao controle negativo neste tempo ($p < 0,001$).

Com o passar dos dias de tratamento de bioaugmentação, observou-se que o isolado BPH 1.5 apresentou uma redução significativa de pH do meio entre os tempos 1 e 7 ($p < 0,001$), porém no tempo 14 dias o pH aumentou significativamente quando comparado ao tempo 7 ($p < 0,001$). Com relação às alterações de pH do meio pelos micro-organismos leveduriformes, houve redução significativa pelos isolados BPH 2.1 ($p < 0,001$) e BPH 2.3 ($p < 0,01$) entre os tempos 1 e 7 e no tempo 14 o isolado BPH 2.1 apresentou reduzir significativamente o pH ($p < 0,001$) quando comparado ao tempo 1.

Com relação ao tratamento conjunto de bioaugmentação e bioestimulação houve uma redução significativa no pH apenas para os isolados leveduriformes. Todos os isolados leveduriformes reduziram o pH do meio em todos os tempos deste tratamento quando comparada os ao controle negativo de cada tempo ($p < 0,001$). Estes resultados indicam que estes micro-organismos estão acidificando o meio em ambos os tratamentos.

Na Tabela 10, podemos observar as alterações causadas no pH pelos micro-organismos nos tratamentos contendo água marinha.

Tabela 10: Avaliação de pH da fase aquosa dos micro-organismos nos diferentes tratamentos em água marinha.

	Bioaugmentação			Bioaugmentação + Bioestimulação		
	1 dia	7 dias	14 dias	1 dia	7 dias	14 dias
C N	7,7 ± 0,8	7,8 ± 0,4	7,7 ± 0,8	5,4 ± 1,1	5,4 ± 0,7	5,4 ± 1,0
BPH 1.4	8,0 ± 0,2	7,6 ± 0,0	7,8 ± 0,0	5,5 ± 0,0	5,3 ± 0,0	5,7 ± 0,0
BPH 1.5	8,2 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,0	5,6 ± 0,0	5,3 ± 0,0	5,7 ± 0,0
BPH 1.14	8,3 ± 0,0	7,8 ± 0,0	7,9 ± 0,0	5,5 ± 0,0	5,3 ± 0,0	5,6 ± 0,0
BPH 2.1	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,0	7,1 ± 0,0	3,0 ± 0,5 A	2,4 ± 0,0 A	2,9 ± 0,0 A
BPH 2.2	7,4 ± 0,3	7,5 ± 0,7	7,5 ± 0,2	4,0 ± 0,4 B	3,8 ± 0,7 A	2,8 ± 0,2 Aah
BPH 2.3	6,4 ± 0,4 B	5,3 ± 0,1 Ae	5,1 ± 0,2 Aa	2,8 ± 0,4 A	2,8 ± 0,0 A	3,0 ± 0,0 A

Letras maiúsculas para comparação de cada isolado com C N no respectivo tempo, onde ^A=p<0,001, ^B=p<0,01, ^C=p<0,05. Letras minúsculas para comparação entre os tempos 1 e 14 para cada amostra, onde ^a=p<0,001, ^b=p<0,01, ^c=p<0,05; entre tempos 1 e 7 para cada amostra, onde ^d=p<0,001, ^e=p<0,01, ^f=p<0,05; entre tempos 7 e 14, onde ^g=p<0,001, ^h=p<0,01, ⁱ=p<0,05.

No tratamento de bioaugmentação, podemos identificar uma redução de pH apenas para o isolado BPH 2.3 quando comparado ao controle negativo de cada tempo. Esta redução ocorre em todos os tempos determinados, sendo mais significativa nos dias 7 e 14 (p<0,001). Com relação aos tempos de tratamento, o isolado BPH 2.3 mostrou reduzir significativamente o pH do meio no tempo 7 dias quando comparado ao tempo 1 dia (p<0,01), além disso, diminui significativamente também o pH do meio no tempo 14 dias, quando comparado ao tempo 1 dia (p<0,001). Já para os demais micro-organismos não houve diferença significativa nem em relação ao controle negativo dos meios, nem em relação aos tempos de tratamento.

Adicionalmente, quando avaliamos as medidas de pH no tratamento conjunto de bioaugmentação e bioestimulação, podemos observar que existe uma diminuição bastante significativa para os três isolados leveduriformes.

Conforme observado nos dois tratamentos, tanto com água destilada quanto com água marinha, principalmente as leveduras são capazes de acidificar os meios, o que nos

permite sugerir que esteja ocorrendo a liberação de metabólitos ácidos por estes micro-organismos.

Estudos demonstram que a acidificação do meio pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos pelos micro-organismos durante a degradação de hidrocarbonetos, estes podem ser produzidos antes de serem incorporados na via do ácido cítrico, pela produção de polímeros extracelulares (Bacosa *et al.*, 2010; Bento *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2006). Reduções de pH podem ser detectadas em decorrência tanto da liberação de metabólitos, quanto devido a lise celular durante a degradação dos hidrocarbonetos presentes no diesel, conforme descrito por Bucker *et al.* (2011).

De acordo com Dhote *et al.* (2010), o pH pode ser um fator que afeta a diversidade e atividade microbiana, podendo atuar no controle das atividades enzimáticas e na solubilidade de nutrientes.

Noparat e colaboradores (2014), também demonstram que alterações ácidas nos meios de cultivo podem interferir no crescimento microbiano, na produção de emulsões e também nas medidas de TS, durante a degradação de ambientes contendo óleo lubrificante.

Outros autores descrevem reduções de pH ocasionadas pela adição de micro-organismos em processos de remediação. No estudo realizado por Verma *et al.* (2006), foi constatado uma diminuição do pH em meio mineral contendo borra oleosa como única fonte de carbono durante 7 dias pela ação de bactérias. Da mesma forma Janbandhu e Fulekar (2011), constataram que a utilização de um consórcio microbiano na remediação de ambientes contendo fenantreno causou redução do pH de 7,0 até 5,2 após 14 dias de tratamento. Cerqueira *et al.* (2012), também observaram uma redução do pH induzida por micro-organismos testados em meio mineral mínimo contaminado com resíduos

petroquímicos, ocasionado possivelmente pela característica ácida dos metabólitos produzidos.

4.5. Análise da recuperação celular

A fim de avaliar se os micro-organismos eram capazes de sobreviver e se desenvolver em ambientes contaminados com petróleo por períodos mais longos de tratamento, foi realizado um ensaio de viabilidade celular, onde todos os micro-organismos estudados durante o ensaio de biorremediação foram submetidos à plaqueamento em meio específico após os 14 dias de cultivo nos diferentes tratamentos (item 3.4). Os resultados deste experimento podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias após 14 dias de tratamento.

Isolado	CFU/mL			
	Água destilada		Água marinha	
	Bioaugmentação	Bioaugmentação + Bioestimulação	Bioaugmentação	Bioaugmentação + Bioestimulação
BPH 1.4	$8,3 \times 10^3$	$8,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$
BPH 1.5	$3,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^1$	$1,6 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$
BPH 1.14	$9,3 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
BPH 2.1	$3,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
BPH 2.2	$5,9 \times 10^3$	$6,6 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$7,4 \times 10^8$
BPH 2.3	$5,4 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$

Como podemos observar, foi possível verificar crescimento microbiano de todos os micro-organismos após o final de todos os tratamentos utilizados, demonstrando que os seis micro-organismos podem estar utilizando o petróleo como única fonte de carbono por

até 14 dias. Com relação ao tratamento de bioaugmentação contendo água destilada e 2% de petróleo bruto, houve maior recuperação celular dos isolados BPH 2.1 e BPH 2.2 (10^7 células/mL), mostrando que estes são os micro-organismos com a maior capacidade de crescimento nestas condições. O isolado BPH 1.14 foi o micro-organismo que obteve o menor crescimento microbiano observado nestas condições (10^1 células/mL).

Já, especificamente no tratamento de bioaugmentação com bioestimulação em meio contendo água destilada contaminada por petróleo, observou-se que o isolado BPH 2.1 teve maior crescimento (10^8 células/mL). Os micro-organismos BPH 1.4, BPH 2.2 e BPH 2.3 também obtiveram crescimentos satisfatórios (entre 10^7 e 10^6 células/mL). O isolado BPH 1.5 obteve o menor crescimento microbiano observado nestas condições (10^1 células/mL).

Em relação ao tratamento de bioaugmentação contendo água marinha com 2% de petróleo pode ser observado crescimento bacteriano bastante considerável por todos os micro-organismos (entre 10^7 e 10^6 células/mL). O mesmo ocorreu no tratamento conjunto de bioaugmentação e bioestimulação com contagem de UFC de 10^6 , 10^7 e 10^8 células/mL.

Desta forma, a utilização do petróleo como fonte alternativa de carbono e de energia para micro-organismos se torna uma alternativa ambientalmente favorável visto que esse óleo é altamente recalcitrante constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, e estes micro-organismos devem estar metabolizando este poluente.

4.6. Identificação molecular dos micro-organismos selecionados

Após todos os testes prévios já citados, os seis micro-organismos citados como promissores degradadores de hidrocarbonetos de petróleo foram identificados por técnicas moleculares. A análise da sequência parcial do gene 16S rDNA mostrou que todas as

bactérias isoladas no meio contendo petróleo pertencem ao gênero *Bacillus* (Tabela 12). A partir, da análise da sequência 26S de rDNA, verificou-se que dois dos isolados leveduriformes selecionados pertenciam ao gênero *Yarrowia* e o outro ao gênero *Candida* (Tabela 12).

Tabela 12: Identificação molecular dos micro-organismos selecionados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos.

Isolado	Identificação	Identidade (%)
BPH 1.4	<i>Bacillus amyloliquefacens</i>	100
BPH 1.5	<i>Bacillus subtilis</i>	99
BPH 1.14	<i>Bacillus megaterium</i>	99
BPH 2.1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	97
BPH 2.2	<i>Candida intermedia</i>	98
BPH 2.3	<i>Yarrowia lipolytica</i>	97

Relatos da literatura demonstram que as bactérias do gênero *Bacillus* são comumente encontradas entre as comunidades microbianas de petróleo, em função do seu alto potencial de utilização de hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (Toledo *et al.*, 2006). Diversos trabalhos têm demonstrado o isolamento de *Bacillus* em amostras contaminadas com hidrocarbonetos e sua potencialidade no tratamento de derrames de óleos (Bento *et al.*, 2005; Da Cruz *et al.*, 2011; Ijah e Antai, 2003; Nkwelang *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por (Ijah e Antai, 2003), foi verificado que o gênero *Bacillus sp.* apareceu como o isolado predominante entre todas as bactérias degradadoras de óleo cru caracterizadas de amostras de solo com elevado índice de contaminação.

Por sua vez, na revisão de Zhu e colaboradores (2001), foi reportada a importância de espécies do gênero *Bacillus* na degradação de hidrocarbonetos em ambientes tanto de água doce quanto de água marinha. Hossein (2010), isolou bactérias de quatro gêneros a

partir de solo contaminado com petróleo: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*, após, a capacidade destes micro-organismos crescerem na presença de óleo e alguns hidrocarbonetos aromáticos, bem como suas habilidades de biodegradação foram investigadas.

Concordando com nosso estudo, Chaillan e colaboradores (2004), em sua pesquisa, isolaram fungos de diferentes gêneros de solo contaminado com petróleo, entre os micro-organismos isolados, destacamos as leveduras dos gêneros *Candida* e *Yarrowia*. Adicionalmente, Bogusławska-Wąs e Dąbrowski (2001), isolaram de ambientes aquáticos, contaminados por hidrocarbonetos, espécies de leveduras como: *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum* sp. e *Trichosporon mucoides*.

É importante ressaltar que a utilização dos micro-organismos isolados neste estudo se torna possível para a biorremediação, já que nenhum deles é caracterizado como patogênico.

4.7. Avaliação da capacidade degradativa de hidrocarbonetos realizada pelo consórcio microbiano

A partir dos resultados preliminares sugerindo a capacidade degradativa dos isolados obtidos neste trabalho, foram selecionados os quatro micro-organismos que mais se destacaram para compor o consórcio microbiano: BPH 1.4, BPH 1.5, BPH 2.2 e BPH 2.3. Dessa forma, o consórcio microbiano foi formado por duas bactérias e duas leveduras.

Os micro-organismos quando em consórcios apresentam melhor capacidade de utilizar um grande número de hidrocarbonetos como fonte de carbono, podendo mineralizá-los completamente pela ação metabólica de mais de uma linhagem de micro-

organismos (Jacques *et al.*, 2007). O emprego de culturas mistas em ambientes contaminados com óleo tem se mostrado mais vantajoso em relação às culturas puras devido aos efeitos das interações de sinergismo entre os membros das associações. O cometaólito uma vez transformado por uma determinada espécie pode resultar em uma substância útil para outra espécie, podendo levar a uma completa degradação do produto (Pedroti, 2007).

Estudos tem comprovado que a degradação completa de hidrocarbonetos envolve o uso de consórcios microbianos, incluindo formas procarióticas e eucarióticas, e não somente uma única espécie (Rizzo *et al.*, 2006).

Desta forma, para avaliar a eficiência do consórcio microbiano formado, a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo foi avaliada ao final de 40 dias de tratamento de bioaumentação com o consórcio em meio contendo água marinha contaminada com 2% de petróleo bruto, por análise cromatográfica das faixas de gasolina, querosene, diesel e óleo lubrificante, que compreendem cadeias de carbono de C8 a C40. A concentração de TPH das amostras está demonstrada na Figura 15.

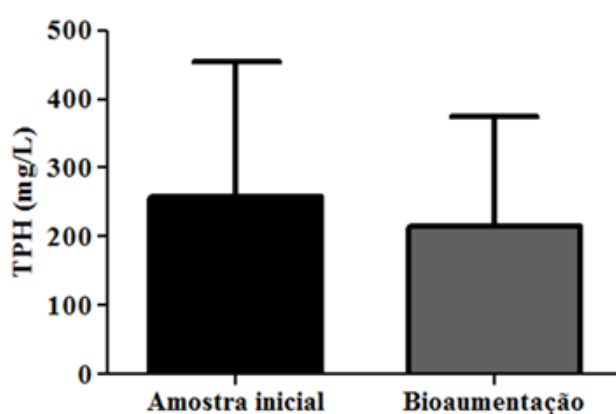


Figura 15: Quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo em tratamento de bioaumentação com consórcio microbiano em meio contendo água marinha contaminada com 2% de petróleo.

Esta análise preliminar mostra que a concentração de TPH na amostra inicial, ou seja, sem a aplicação do consórcio, era de 285,5 mg/L. Entretanto, após o tratamento de biorremediação, com utilização do consórcio microbiano formulado, a concentração de TPH observada foi de 215,5 mg/L. Estes resultados não mostraram-se estatisticamente diferentes, porém, esta discreta redução nos níveis de TPH com a aplicação do consórcio microbiano, mostra que o mesmo exibe uma tendência a reduzir os níveis de TPH em 25%, sendo necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

Este resultado pode ser explicado pela grande variância observada entre as triplicatas da análise de cromatografia, como sabemos o petróleo é uma substância bastante heterogênea, e muitos destes compostos podem ficar retidos durante o processo de fracionamento. Outro fator importante é a competição dos micro-organismos pelo contaminante, em condições naturais o desequilíbrio dos fatores abióticos pode tornar o processo inviável e reduzir a exposição da população especializada dos micro-organismos inoculados, e assim com as condições naturais de predação e competição também podem diminuir a eficiência da biodegradação (Tyagi *et al.*, 2011).

Outra hipótese seria em relação ao tempo de tratamento empregado, já que alguns autores demonstram níveis elevados de degradação de hidrocarbonetos por consórcios microbianos apenas após 60 dias de aplicação.

Um estudo realizado por Bento *et al.* (2005) avaliou a porcentagem de degradação das frações leves e pesadas de hidrocarbonetos de óleo diesel em dois tipos de solos contaminados, eles observaram que para um dos solos a degradação das frações pesadas do óleo era dependente do tempo de incubação, com cerca de 30% de degradação apenas após 12 semanas de bioaugmentação com o consórcio.

Cerqueira *et al.* (2011), analisaram a capacidade degradativa de um consórcio microbiano formado a partir de bactérias previamente isoladas de um ambiente com histórico de contaminação com resíduos da indústria petroquímica, as quais tinham tolerância e habilidade de se desenvolver em concentrações variáveis de contaminantes. Eles observaram que as frações saturadas do resíduo petroquímico eram mais facilmente degradadas, cerca de 90% após 40 dias de tratamento, enquanto que as frações aromáticas tinham uma redução apenas de 50% após o mesmo tempo de tratamento.

De acordo com Mohamed *et al.* (2006), a biodegradabilidade dos componentes do petróleo segue uma ordem preferencial de degradação: n-alcenos > cadeia de alcanos ramificadas > cadeias de alcenos ramificadas > monoaromáticos > cicloalcanos > poliaromáticos > asfaltenos. Desta maneira a composição do petróleo com cadeias longas de carbonos e anéis aromáticos dificulta a degradação a curto prazo. Outra possibilidade refere-se ainda à repressão catabólica, em que um composto não pode ser degradado na presença de um outro composto, atuando como um repressor para a síntese de um grande número de enzimas envolvidas em vários percursos metabólicos (Cerqueira *et al.*, 2011). Devido à sua estrutura, compostos aromáticos são menos susceptíveis de serem atacados e consumidos como uma fonte de carbono pelos micro-organismos. Adicionalmente, conforme Mohamed *et al.* (2006), o consumo primário de/ou depleção de alcanos (fração saturada) pode resultar em altos teores das frações de poliaromáticos e asfaltenos (fração insaturada com uma elevada taxa de H/C), que são mais resistentes à biodegradação.

Assim mais análises são necessárias, para comprovar o potencial de degradação realizado pelo consórcio microbiano selecionado.

5. CONCLUSÕES

Em resumo, este estudo demonstrou que é possível isolar diferentes micro-organismos em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, já que foram isolados 19 micro-organismos a partir de solo contaminado com petróleo, dos quais três bactérias (BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 1.14) e três leveduras (BPH 2.1, BPH 2.2 e BPH 2.3) mostraram-se promissoras para utilização em processos de remediação, por destacarem-se nos testes de oxidação (indicador redox TTC) e solubilização de hidrocarbonetos na avaliação visual. Além disso, os isolados BPH 1.4, BPH 1.5 e BPH 2.2 foram capazes de produzir biossurfactantes do tipo ramnolipídeos.

A medida do índice de emulsificação de todos os seis isolados selecionados foi eficaz para determinar a produção de biossurfactantes, onde se obteve $IE_{24h} > 39\%$ para todos. Sendo assim, nossos resultados comprovam a produção de bioemulsificantes pelos seis micro-organismos, tanto extracelularmente quanto ligados à parede celular.

Com relação aos testes de tensão superficial, de uma forma geral a maioria dos micro-organismos foram capazes de diminuir tais níveis em ambos os tratamentos: bioaugmentação e bioaugmentação juntamente com bioestimulação, tanto para água destilada quanto para água marinha, porém os isolados leveduriformes mostraram-se mais eficazes.

Também foi avaliada a produção de metabólitos durante os tratamentos de remediação. Somente os isolados leveduriformes apresentaram-se capazes de acidificar os meios, o que permite sugerir que esteja ocorrendo a liberação de metabólitos ácidos por estes micro-organismos.

Além disso, após o final dos tratamentos utilizados, foi possível verificar crescimento microbiano de todos os micro-organismos, o que sugere que os seis micro-

organismos possam estar utilizando o petróleo como única fonte de carbono por até 14 dias.

Adicionalmente, todos os micro-organismos foram identificados molecularmente e a sua aplicação em processos de biorremediação foi confirmada, partindo do princípio que nenhum destes é caracterizado como patogênico. Por fim, foi realizado um tratamento à longo prazo de bioaugmentação com o consórcio microbiano selecionado, o que demonstrou haver uma redução de 25% nos níveis de TPHs.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, concluímos que os micro-organismos identificados são promissores para o uso em processos de biorremediação, sendo necessária a realização de mais estudos para o desenvolvimento de uma formulação mais eficaz que possa ser utilizada diretamente no ambiente de óleo contaminado.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho resultou nas seguintes perspectivas:

- Quantificar a degradação de hidrocarbonetos de petróleo de cada isolado;
- Identificar as frações de hidrocarbonetos assimiladas durante o processo de biorremediação das águas contaminadas com petróleo, através do método de CG-FID, para que se possa formular um novo consórcio microbiano;
- Analisar o índice de emulsificação, tensão superficial e produção de metabólitos do consórcio microbiano;
- Testar a eficiência de remediação do novo consórcio microbiano, para utilização em larga escala (200 litros) para tratamentos em água marinha e água doce.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F. e DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.

AL-TAHHAN, R. A.; SANDRIN, T. R.; BODOUR, A. A. e MAIER, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3262-3268, 2000.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A. e SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 114, n. 0, p. 324-333, 2014.

ALUYOR, E. O. e ORI-JESU, M. Biodegradation of mineral oils – A review. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 6, 2009.

AMOURIC, A.; QUÉMÉNEUR, M.; GROSSI, V.; LIEBGOTT, P. P.; AURIA, R. e CASALOT, L. Identification of different alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus ruber* strain SP2B, an hexane-degrading actinomycete. *Journal of applied microbiology*, v. 108, n. 6, p. 1903-1916, 2010.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Investigação do Incidente de Vazamento de Petróleo no Campo de Frade - Relatório Final. Rio de Janeiro: 2012.

ANP. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2013. Rio de Janeiro: p.236, 2013.

API. American Petroleum Institute. Risk-Based Decision-Making for Assessing Petroleum Impacts at Exploration and Production Sites. Washington.: Department of Energy and the Petroleum Environmental Research Forum. p.245, 2001. ISBN 0-9717288-0-1.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev*, v. 45, n. 1, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M. Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 35, n. 1-3, p. 317-327, 1995.

ATLAS, R. M. e CERNIGLIA, C. E. Bioremediation of Petroleum Pollutants - Diversity and Environmental Aspects of Hydrocarbon Biodegradation. *Bioscience*, v. 45, n. 5, p. 332-338, 1995.

BACOSA, H.; SUTO, K. e INOUE, C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 8, p. 702-710, 2010.

BALACHANDRAN, C.; DURAI PANDIYAN, V.; BALAKRISHNA, K. e IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces sp.* (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour Technol*, v. 112, p. 83-90, 2012.

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

BAMFORTH, S. M. e SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J. e MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BEILEN, J. B. V. e FUNHOFF, E. G. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 308-314, 2005.

BELHAJ, A.; DESNOUES, N. e ELMERICH, C. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB* related genes. *Research in microbiology*, v. 153, n. 6, p. 339-344, 2002.

BENTO, F.; ENGLERT, G.; GAYLARDE, C. e MULLER, I. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. *Materials and Corrosion*, v. 55, n. 8, p. 577-585, 2004.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.; OKEKE, B. C. e FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol*, v. 96, n. 9, p. 1049-55, 2005.

BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. e CAMARGO, F. A. O. Biossurfactantes. In: AZEVEDO, J. L. e MELO, I. S. (Ed.). *Microbiologia Ambiental*. ed.2. Jaguariúna: Embrapa. p.151-184, 2008. ISBN 978-85-85771-44-7.

BERTINI, I.; BRIGANTI, F.; MANGANI, S.; NOLTING, H. F. e SCOZZAFAVA, A. Biophysical investigation of bacterial aromatic extradiol dioxygenases involved in biodegradation processes. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 144, n.0, p.321-345, 1995.

BIERMANN, M.; LANGE, F.; PIORR, R.; PLOOG, U.; RUTZEN, H.; SCHINDLER, J. e SCHMID, R. Synthesis of Surfactants. In: FALBE, J. (Ed.). *Surfactants in Consumer Products*: Springer Berlin Heidelberg cap. 3, p.23-132. 1987. ISBN 978-3-642-71547-1.

BODOUR, A. A. e MAIER, R. M. Biosurfactants: types, screening methods, and applications. *Encyclopedia of environmental microbiology*, 2002.

BOGUSŁAWSKA-WĄS, E. e DĄBROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 203, n. 5–6, p. 451-458, 2001.

BOON, N.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W. e SICILIANO, S. D. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, n. 3, p. 1511-20, 2003.

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

BORSATO, D.; GALAO, O. F. e MOREIRA, I. Combustíveis Fósseis - Carvão e Petróleo. ed.1. Londrina: 2009. ISBN 9788572164801.

BP. BP Statistical Review of World Energy. ed.63. Reino Unido: Pureprint Group Limited, 2012.

BRADDOCK, J. F. e CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline-and diesel-degrading microorganisms. *Bioremediation Journal*, v. 3, n. 2, p. 81-84, 1999.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 001 de 23 de janeiro de 1986.

BRASIL. Lei Federal n° 7.735 de 22 de fevereiro de 1989.

BRASIL. Lei Federal n° 9.478 de 06 de agosto de 1997a.

BRASIL. Lei Federal n° 9.537 de 11 de dezembro de 1997b.

BRASIL. Decreto nº 2.953 de 28 de janeiro de 1999.

BRASIL. Lei Federal nº 9.966 de 28 de abril de 2000a.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 273 de 29 de novembro de 2000b.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 420 de 12 de fevereiro de 2004.

BÜCKER, F.; SANTESTEVAN, N. A.; ROESCH, L. F.; SEMINOTTI JACQUES, R. J.; PERALBA, M. D. C. R.; CAMARGO, F. A. D. O. e BENTO, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 1, p. 172-178, 2011.

CAMEOTRA, S. S. e SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, n. 3, p. 274-280, 2008.

CAMEOTRA, S. S. e SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial cell factories*, v. 8, n. 1, p. 16, 2009.

CAMILLI, R.; REDDY, C. M.; YOERGER, D. R.; VAN MOOY, B. A.; JAKUBA, M. V.; KINSEY, J. C.; MCINTYRE, C. P.; SYLVA, S. P. e MALONEY, J. V. Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at Deepwater Horizon. *Science*, v. 330, n. 6001, p. 201-4, 2010.

CASARINI, D. C. P.; DIAS, C. L. e LEMOS, M. M. G. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo.: CETESB, 2001.

CASIDA, L. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and environmental microbiology*, v. 34, n. 6, p. 630-636, 1977.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A.; MARIA DO CARMO, R. P. e BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2012.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M. H.; CAMARGO, F. A.; DO CARMO, R. P. M. e BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour Technol*, v. 102, n. 23, p. 11003-10, 2011.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O.; KATO, M. T.; DE LIMA, E. S. e GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*, v. 113, n. 0, p. 510-516, 2012.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y. H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. e OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in microbiology*, v. 155, n. 7, p. 587-595, 2004.

CHAUHAN, A.; FAZLURRAHMAN; OAKESHOTT, J. G. e JAIN, R. K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J Microbiol*, v. 48, n. 1, p. 95-113, 2008.

CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł. e CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 401-419, 2012.

CLARK, R. C., JR. e BROWN, D. W. Petroleum properties and analyses in biotic and abiotic systems. In: MALINS, D. C. (Ed.). Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms. New York p.1-89, 1977.

COHEN, M. A. Water pollution from oil spills. In: (Ed.). Encyclopedia of Energy, Natural Resource, and Environmental Economics. ed.1: Elsevier Science, v.3 p.p.121–126. 2013. ISBN 9780123750679.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E. e COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010.

COLLA, T.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; DE SOUZA, M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G.; FRAZZON, A.; CAMARGO, F. e BENTO, F. Bioremediation assessment of diesel–biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 4, p. 2592-2602, 2014.

COLWELL, R. R. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *CRC Crit Rev Microbiol*, v. 5, n. 4, p. 423-45, 1977.

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

COSTA, S. G.; NITSCHKE, M.; LEPINE, F.; DÉZIEL, E. e CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.

CRAWFORD, R. L. The Prokaryotes: Vol. 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. *Bioremediation*. SPRINGER. New York. v.1 2006.

CRONE, T. J. e TOLSTOY, M. Magnitude of the 2010 Gulf of Mexico oil leak. *Science*, v. 330, n. 6004, p. 634, 2010.

DA CRUZ, G. F.; DE VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GARCIA, I. N.; DE OLIVEIRA, V. M.; DOS SANTOS NETO, E. V. e MARSAIOLI,

A. J. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? *AMB Express*, v. 1, n. 1, p. 47, 2011.

DA SILVA, L. J.; ALVES, F. C. e DE FRANCA, F. P. A review of the technological solutions for the treatment of oily sludges from petroleum refineries. *Waste Manag Res*, v. 30, n. 10, p. 1016-30, 2012.

DAGLEY, S. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in pseudomonads. The bacteria: a treatise on structure and function, 1986.

DAS, K. e MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 7, p. 1339-1345, 2007.

DAS, N. e CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int*, v. 2011, p. 941810, 2011.

DE LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol*, v. 19, n. 6, p. 579-89, 2008.

DESAI, J. D. e BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O. A. e VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1440, n. 2-3, p. 244-252, 1999.

DHOTE, M.; JUWARKAR, A.; KUMAR, A.; KANADE, G. e CHAKRABARTI, T. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 329-335, 2010.

DYBAS, M. J.; HYNDMAN, D. W.; HEINE, R.; TIEDJE, J.; LINNING, K.; WIGGERT, D.; VOICE, T.; ZHAO, X.; DYBAS, L. e CRIDDLE, C. S. Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation. *Environ Sci Technol*, v. 36, n. 16, p. 3635-44, 2002.

EL FANTROUSSI, S. e AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 268-275, 2005.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas da poluição ambiental. São Paulo: Springer, 1980.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUDA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N. e SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum sp.* 1C and *Brevibacterium sp.* 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 8, p. 1182-1188, 2011.

FULLER, C.; BONNER, J.; PAGE, C.; ERNEST, A.; MCDONALD, T. e MCDONALD, S. Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. *Environ Toxicol Chem*, v. 23, n. 12, p. 2941-9, 2004.

FUNHOFF, E. G. e VAN BEILEN, J. B. Alkane activation by P450 oxygenases. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 25, n. 2-4, p. 186-193, 2007.

GENTRY, T.; RENSING, C. e PEPPER, I. A. N. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 5, p. 447-494, 2004.

GIBSON, D. T. Microbial degradation of organic compounds. *Marcel Dekker*, 1984. ISBN 0824771028.

HARAYAMA, S.; KOK, M. e NEIDLE, E. L. Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 565-601, 1992.

HOMMEL, R. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, v. 1, n. 2-3, p. 107-119, 1990.

HOSOKAWA, R.; NAGAI, M.; MORIKAWA, M. e OKUYAMA, H. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 9, p. 1519-1528, 2009.

HOSSEIN, G. Biodegradation of petroleum and aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 2010.

HUGHES, K. A.; BRIDGE, P. e CLARK, M. S. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the total environment*, v. 372, n. 2, p. 539-548, 2007.

IJAH, U. J. J. e ANTAI, S. P. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, n. 2, p. 93-99, 2003.

I TOPF. International Tanker Owners Pollution Federation Limited. USA 2014.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I. e CAMARGO, F. A. D. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R. J. S.; SANTOS, E. C.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; SA, E. L. S. e CAMARGO, F. A. O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 56, n. 3, p. 143-150, 2005.

JANBANDHU, A. e FULEKAR, M. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 187, n. 1, p. 333-340, 2011.

JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 71, pp. 4121-4126, 1949.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y. e HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, v. 133, n. 1, p. 71-84, 2005.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T. e HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *J Environ Manage*, v. 71, n. 2, p. 95-122, 2004.

KILLOPS, S. e KILLOPS, V. Introduction to Organic Geochemistry. ed.2. Blackwell Publishing, p.406, 2005. ISBN 0-632-06504-4.

KIRTLAND, B. C. e AELION, C. M. Petroleum mass removal from low permeability sediment using air sparging/soil vapor extraction: impact of continuous or pulsed operation. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 41, n. 3-4, p. 367-383, 2000.

KLÜBER, H. D.; LECHNER, S. e CONRAD, R. Characterization of populations of aerobic hydrogen-oxidizing soil bacteria. *FEMS microbiology ecology*, v. 16, n. 2, p. 167-176, 1995.

LEAHY, J. G. e COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*, v. 54, n. 3, p. 305-15, 1990.

LI, X.; LIN, X.; LI, P.; LIU, W.; WANG, L.; MA, F. e CHUKWUKA, K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *J Hazard Mater*, v. 172, n. 2-3, p. 601-5, 2009.

LIU, H.; WANG, H.; CHEN, X.; LIU, N. e BAO, S. Biosurfactant-producing strains in enhancing solubilization and biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, n. 7, p. 4581-4589, 2014.

LIU, J.; HUANG, X. F.; LU, L. J.; XU, J. C.; WEN, Y.; YANG, D. H. e ZHOU, Q. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes sp.* S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. *J Hazard Mater*, v. 183, n. 1-3, p. 466-73, 2010.

MAIER, R. M. e SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 54, n. 5, p. 625-33, 2000.

MAKKAR, R. S. e ROCKNE, K. J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F. e VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology*, v. 58, n. 4, p. 441-448, 2003.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S. e CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 25, p. 269-274, 2008.

MARÍN, M. M.; SMITS, T. H.; VAN BEILEN, J. B. e ROJO, F. The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control. *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 14, p. 4202-4209, 2001.

MCKEW, B. A.; COULON, F.; YAKIMOV, M. M.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; SMITH, C. J.; OSBORN, A. M.; TIMMIS, K. N. e MCGENITY, T. J. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol*, v. 9, n. 6, p. 1562-71, 2007.

MOHAMED, M.; AL-DOUSARY, M.; HAMZAH, R. e FUCHS, G. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 58, n. 3, p. 213-223, 2006.

MOLINA, M. C.; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L. F.; SANZ, R.; SIMARRO, R.; SÁNCHEZ, I. e SANZ, J. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, v. 20, n. 6, p. 789-800, 2009.

MOSCOSO, F.; TEIJIZ, I.; DEIVE, F. J. e SANROMAN, M. A. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour Technol*, v. 119, p. 270-6, 2012.

MROZIK, A. e PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, v. 165, n. 5, p. 363-375, 2010.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 14, n. 5, p. 372-378, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. Washington: The National Academies Press., 2003.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; NORF, H. e KALOGERAKIS, N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Marine Pollution Bulletin*, v. 77, n. 1-2, p. 37-44, 2013.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. e CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, v. 21, n. 6, p. 1593-1600, 2005.

NITSCHKE, M. e PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.

NKWELANG, G.; KAMGA, H. F.; NKENG, G. E. e ANTAI, S. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 8, 2008.

NOPARAT, P.; MANEERAT, S. e SAIMMAI, A. Application of Biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the Biodegradation of Used Lubricating Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 8, p. 3949-3963, 2014.

OLGA, P.; PETAR, K.; JELENA, M. e SRDJAN, R. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. *Journal of Microbiological Methods*, v. 74, n. 2-3, p. 110-113, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; CARA, D. V. C.; XAVIER, P. G.; SOBRAL, L. G. S.; LIMA, R. B. e ALMEIDA, A. L. Fitorremediação: O estado da arte. Rio de Janeiro: CETEM/MCT., 2006. ISBN 978-85-61121-11-2.

OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K. e HEIPIEPER, H. J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 3, p. 1497-1500, 2009.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. e CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci*, v. 12, n. 1, p. 633-54, 2011.

PARK, I.-S. e PARK, J.-W. Determination of a risk management primer at petroleum-contaminated sites: Developing new human health risk assessment strategy. *Journal of Hazardous Materials*, v. 185, n. 2-3, p. 1374-1380, 2011.

PEDROTI, G. I. Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico, Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 1997.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R. e BANAT, I. M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. In: TIMMIS, K. (Ed.) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: Springer Berlin Heidelberg cap. 103, p.1501-1512, 2010. ISBN 978-3-540-77584-3.

PETERS, K. E. e MOLDOWAN, J. M. The biomarker guide : interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. ISBN 0130867527.

PETROBRAS. Petróleo Brasileiro S. A. Relatório De Tecnologia Petrobras, 2012.

PETROBRAS. Petróleo Brasileiro S. A. Relatório de Sustentabilidade 2013. Rio de Janeiro: 2013.

PRICE, N. P. J.; RAY, K. J.; VERMILLION, K. E.; DUNLAP, C. A. e KURTZMAN, C. P. Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydrate Research*, v. 348, n. 0, p. 33-41, 2012.

RAHMAN, K.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R. e BANAT, I. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, v. 90, n. 2, p. 159-168, 2003.

RAHMAN, P. K. S. M. e GAKPE, E. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants – Review. . *Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

REDDY, K. R.; ADAMS, J. F. e RICHARDSON, C. Potential Technologies for Remediation of Brownfields. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management.*, v. 3, n. 2, p. p.61–68, 1999.

RICHARD, J. Y. e VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, n. 2–3, p. 93-100, 1999.

RISER-ROBERTS, E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. CRC Press, 1998. ISBN 1420050575.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C. e SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2006. ISBN 978-85-61121-03-7.

RUGGERI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S. e TAMBURINI, E. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n. 7, p. 936-942, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. e IRWIN, N. Molecular cloning: a laboratory manual- /Joseph Sambrook, David W. Russell;[assoc. ed.: Nina Irwin, Kaaren A. Janssen]. 2001.

SHARMA, A. e REHMAN, M. B. Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon in soil by indigenous bacterial consortium. *Indian J Exp Biol*, v. 47, n. 9, p. 766-9, 2009.

SIEGMUND, I. e WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.

SIMS, R. C.; SIMS, J. L.; SORENSEN, D. L. e HASTINGS, L. L. Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results. USEPA e Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory., 1988.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D. e WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv*, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SMYTH, T.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R. e BANAT, I. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: (Ed.). Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology: Springer p.3705-3723, 2010. ISBN 3540775846.

SPEERS, C. e WHITEHEAD, V. Crude Petroleum. In: (Ed.). Organic Geochemistry.: Springer Berlin Heidelberg p.638-675, 1969. ISBN 978-3-642-87736-0.

SPEIGHT, J. G. The Chemistry and Technology of Petroleum. ed.5. CRC Press, p.953 2014. ISBN 9781439873892.

SPIES, R. B.; RICE, S. D.; WOLFE, D. A. e WRIGHT, B. A. The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment, Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium. Bethesda: American Fisheries Society, 1996.

SWANNELL, R. P.; LEE, K. e MCDONAGH, M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev*, v. 60, n. 2, p. 342-65, 1996.

TISSOT, B. P. e WELTE, D. H. Petroleum Formation and Occurrence. A New Approach to Oil and Gas Exploration. ed.2. New York: Springer Berlin Heidelberg, 1984. ISBN 978-3-642-87813-8.

TOLEDO, F.; CALVO, C.; RODELAS, B. e GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and applied microbiology*, v. 29, n. 3, p. 244-252, 2006.

TPHCWG. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group. Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. Amherst Scientific Publishers.,98, 1998. ISBN 1-884-940-14-5.

TRAPP, S. e KARLSON, U. Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *Journal of Soils and Sediments*, v. 1, n. 1, p. 37-43, 2001.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F. e SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, v. 58, n. 4, p. 515-522, 2005.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R. e DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

UENO, A.; ITO, Y.; YUMOTO, I. e OKUYAMA, H. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 12, p. 1739-1745, 2007.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. A citizen's guide to natural attenuation. Office of Solid Waste and Emergency Response. United States.: EPA 542-F-96-015., 1996.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. A citizen's guide to bioremediation. Office of Solid Waste and Emergency Response. United States: EPA 542-F-12-003, , 2012.

VAN BEILEN, J. e FUNHOFF, E. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 74, n. 1, p. 13-21, 2007.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A. e WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Adv*, v. 24, n. 6, p. 604-20, 2006.

VARADAVENKATESAN, T. e MURTY, V. R. Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel Bacillus sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, v. 2013, p. 8, 2013.

VASCONCELOS, S. P. Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul). (Tese de doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química., Campinas - SP, 2006.

VECCHIA, R. O meio ambiente e as energias renováveis. Barueri.: Manole., 2010. ISBN 9788598416854.

VERMA, S.; BHARGAVA, R. e PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 57, n. 4, p. 207-213, 2006.

VOLLHARDT, K. P. C. e SCHORE, N. E. Química orgânica: estrutura e função. ed. 4. Porto Alegre: 2004. ISBN 85-363-0413-8.

WHANG, L.-M.; LIU, P.-W. G.; MA, C.-C. e CHENG, S.-S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 1, p. 155-163, 2008.

WILLUMSEN, P. A. e KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1996.

WU, Y.; ZHANG, J.; MI, T.-Z. e LI, B. Occurrence of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the core sediments of the Yellow Sea. *Marine Chemistry*, v. 76, n. 1–2, p. 1-15, 2001.

XU, N.; BAO, M.; SUN, P. e LI, Y. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Bioresour Technol*, v. 149, p. 22-30, 2013.

YUAN, H.; YAO, J.; MASAKORALA, K.; WANG, F.; CAI, M. e YU, C. Isolation and characterization of a newly isolated pyrene-degrading *Acinetobacter* strain USTB-X. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 4, p. 2724-2732, 2014.

ZHU, X.; VENOSA, A. D.; SUIDAN, M. T. e LEE, K. Guidelines for the Bioremediation of Marine shorelines and Freshwater wetlands. U.S. EPA, p.163, 2001.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological reviews*, v. 10, n. 1-2, p. 1, 1946.

8. APÊNDICES

A1. Meio Mineral 1 (MM1)

Solução A	Para 1 litro
KCl	0,7 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	3,0 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g

Solução B	Para 1 litro
MgSO ₄	4,0 g
FeSO ₄	0,2 g
MnCl ₂	0,2 g
CaCl ₂	0,2 g

Colocar 1 mL de Solução B para 1 L de Solução A

A2. Sequências de primers para sequenciamento

F27 - 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

R1492 - 5' TACGGCTACCTTGTTACGAC 3'

A3. Sequências de primers para sequenciamento

NL1 - 5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'

NL4 - 5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'
