

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JACKSON FELTRACO

REMEDIÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS
POR MICRO-ORGANISMOS

Porto Alegre, julho de 2015.

JACKSON FELTRACO

REMEDIAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS
POR MICRO-ORGANISMOS

Trabalho de conclusão de curso
submetido à Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como parte
dos requisitos necessários para a
obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, julho de 2015

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Composição do petróleo	10
1.2 Produção e Acidentes ambientais.....	13
1.3 Técnicas de remediação.....	14
1.3.1 Métodos Naturais	15
1.3.2 Métodos Físicos	16
1.3.3 Métodos Químicos.....	17
1.4 Biorremediação	18
1.5 Disponibilização dos Contaminantes e Produção de Biossurfactantes.....	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Obtenção da amostra	26
3.2 Micro-organismos	26
3.3 Utilização do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).....	26
3.4 Utilização do indicador 2,6-DCPIP.....	27
3.5 Teste em placa para a seleção de micro-organismos degradadores de petróleo	27
3.6 Avaliação da produção de biossurfactantes	28
3.6.1 Teste colorimétrico com azul de metileno.....	28
3.6.2 Índice de emulsificação.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Análise com o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	30
4.2 Indicador 2,6-Diclorofenol indofenol (DCPIP)	32
4.3 Teste prévio em placa com água marinha	35
4.4 Avaliação da produção de biossurfactantes	36

4.4.1	Teste colorimétrico com azul de metileno.....	37
4.4.2	Determinação do índice de emulsificação.....	38
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	42
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe Maria e irmã Jeane, por todo apoio e ensinamentos ao longo da minha vida. Sem vocês, eu não seria nada e obrigado por continuarem insistindo em mim.

Aos meus avós e padrinhos por toda a ajuda fornecida enquanto residi fora da casa dos meus pais. Mais uma vez, obrigado pela confiança.

Aos amigos Bianca, Julio, Gabriela, Thaís, Marcelo, Mariana, Patrícia, Rafael, Raíssa e Taís. Companheiros que a UFRGS me deu e que não esquecerei. Agradeço por todo suporte emocional, encontros e risadas proporcionados. Amo vocês, seus lindos.

Aos meus queridos companheiros diários, meus colegas e amigos dos laboratórios 220 e 217. Sem a companhia e as brincadeiras de vocês, o trabalho teria sido bem difícil. Agradeço imensamente pela ajuda com os experimentos e ao carinho por mim. Jamais esquecerei.

À minha querida MSc. Amanda Pasinato Napp, que foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço por ter sido tão paciente e prestativa comigo. Obrigado também pela amizade e confiança depositados.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Marilene Henning Vainstein, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por todo apoio que me foi dado. Muito obrigado por acreditar em mim e na minha capacidade.

E não menos importante, aos meus companheiros e amigos da Equipe Bela Vista Voleibol, o meu eterno agradecimento por todo apoio e irmandade que manifestaram nesse período. Agradeço por entenderem a minha ausência em alguns treinos e por continuarem mantendo forte essa minha paixão pelo voleibol.

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

RESUMO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos (saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos) de coloração escura, com odor característico e inflamável. Essa substância tem importância em diversos setores, sendo uma das maiores fontes de energia atual. Segundo dados de 2013, a produção mundial de petróleo foi de 86,8 milhões de barris/dia, sendo 2,1 milhões de barris/dia referentes apenas ao Brasil, ocupando a 13^a posição no ranking mundial. Devido a grande exploração e produção deste composto orgânico, durante o seu processamento, refino, transporte e armazenamento podem ocorrer grandes vazamentos, ocasionando sérios impactos ambientais. Assim, a biorremediação aparece como uma técnica promissora de remediação desses ambientes, pois o elevado custo da limpeza dessas áreas gera grandes gastos. Portanto, o objetivo do trabalho foi selecionar micro-organismos e avaliar a capacidade de biorremediação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos. Para a realização desta pesquisa foram utilizados 46 micro-organismos a partir da coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Considerando avaliar a degradação dos hidrocarbonetos, os testes prévios com os indicadores redox TTC (2,3,5-cloro de trifeniltetrazólio) e DCPIP (2,6-Diclorofenol indofenol) foram utilizados. Os micro-organismos selecionados dessa análise foram submetidos a outro teste prévio para avaliar a solubilização do contaminante em água marinha. Para avaliar a produção de biossurfactantes pelos micro-organismos selecionados nos testes anteriores, as técnicas com ramnolipídeos e bioemulsificantes foram realizadas. No final destas análises, 19 micro-organismos foram selecionados como promissores para a remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, entretanto, mais metodologias serão necessárias para comprovar que estes isolados podem ser utilizados para a biorremediação.

Palavras-chave: biorremediação; petróleo; ambientes contaminados.

ABSTRACT

Petroleum is a complex mixture of hydrocarbons (saturated, aromatics, resins and asphaltenes) of dark coloring with distinctive smell and flammable. This substance has huge importance in several sectors, being one of the biggest energy resources nowadays. According to 2013 data, the global production of petroleum was 86,6 millions of barrels/day, being 2,1 millions of barrels/day only from Brazil, which occupies the 13th position in the world ranking. Due to the great exploration and production of this organic compound, during the processing, refining, transportation and storage there can be substantial leaks, causing serious environmental impacts. Thus, bioremediation appears as a promising technique of remediation of these areas, because the high cost used for cleaning these areas generates large expenditures. Therefore, the objective of the study was to select and evaluate the bioremediation capacity by microorganisms in contaminated areas with hydrocarbons. For this research, it has been used 46 microorganisms from the collection of Medically Important Fungi Laboratory and Biotechnology, located in the Biotechnology Center of UFRGS. Considering evaluate the degradation of hydrocarbons, the preliminary tests with redox indicators TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) and DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol) were used. The ones elected to this analysis were subjected to a further pre-test to evaluate the solubilization of the contaminant in seawater. To assess the production of the biosurfactant by the selected microorganisms from the tests above, the techniques and ramnolípídeos bioemulsificantes were performed. The end of this analysis selected 19 microorganisms selected as promising for the remediation of contaminated areas with hydrocarbons. However, further methods are needed to verify that these isolates may be used for bioremediation.

Keywords: bioremediation; petroleum; contaminated environments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais compostos orgânicos encontrados em óleo cru. Fonte: adaptado de Zhu <i>et al.</i> (2001).	11
Figura 2: Diferentes tipos de PAHs. Fonte: adaptado de Chauhan <i>et al.</i> (2008).	12
Figura 3: Mecanismo de solubilização de hidrocarbonetos dentro de micelas de surfactantes. (A) quando a concentração de hidrocarbonetos aumenta e o espaço disponível diminui, os surfactantes tendem a se organizar e se agregar (B) até um ponto chamado de “concentração micelar crítica” (CMC), onde micelas são formadas capturando o contaminante para seu centro hidrofóbico. (C) Uma vez disperso, os hidrocarbonetos se tornam mais disponíveis para absorção pelas células. Fonte: Perfumo <i>et al.</i> (2010).	22
Figura 4: Esquema de relação entre a concentração de biosurfactante, tensão superficial e a formação de micelas. Fonte: adaptado de Pacwa-Plociniczak <i>et al.</i> (2011).	23
Figura 5: Teste realizado com indicador redox TTC, com vista inferior da placa de 96 poços, demonstrando os isolados selecionados no período de 168 horas. Nos poços A1, A5 e A9 estão os controles negativos (sem adição de inóculo). Cada poço corresponde a um micro-organismo e este testado para as três concentrações na mesma placa.	32
Figura 6: Teste realizado com o indicador DCPIP, em placa de 96 poços, no período de 168 horas. Os controles negativos estão nos poços A1, A5 e A9. Vista superior da placa. Cada poço corresponde a um isolado e este testado para as três concentrações de contaminante.	34
Figura 7: Resultados do teste com água marinha em placa de 24 poços com a concentração de 1% de contaminante no período de 168 horas em agitação. (A) RR23, QU31 e 56b (B) 48e, QU20, Ma47b e 39a. (C) RR41, RR49 e RR50 selecionados	35
Figura 8: Placas de 24 poços na concentração de 5% de petróleo no período de 336 horas. (A) o isolado RR214 modificou o contaminante quando comparado com o controle negativo e os controles positivos B1 e B3. (B) os micro-organismos 48e, 56b, E15a, Ma23c, Ma47a, Ma64c e VR138 se apresentaram expressivos na degradação ao final desde período.	36
Figura 9: Estrutura de um ramnolipídeo. Em um monoramnolipídeo, R = H ou R = CO-CH=CH-(CH ₂) ₆ -CH ₃ ; em um diramnolipídeo, R = ramnosil ou R = ramnosil-O-CO-CH=CH-(CH ₂) ₆ -CH ₃ . R1 e R2 = C ₇ H ₁₅	37
Figura 10: Resultado do teste colorimétrico para produção de ramnolipídeos. (A) RR71 e (B) RR46.	38
Figura 11: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados após retirada do excesso de meio rico com presença de células. C- = controle negativo	39
Figura 12: Índice de Emulsificação do sobrenadante, ausência de células, dos micro-organismos testados. O meio rico em excesso foi retirado e lavado com água destilada estéril. C- = controle negativo.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura, estrutura e efeitos dos 16 PAHs definidos como poluentes prioritários.	12
Tabela 2: Opções convencionais de limpeza da linha costeira.....	15
Tabela 3: Relação de micro-organismos selecionados a partir de diferentes concentrações de contaminantes. Os poços foram avaliados quanto a coloração e comparados ao controle negativo.	30
Tabela 4: Relação dos micro-organismos selecionados com o período de incubação com a concentração de contaminante para o teste com o indicador DCPIP.	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Composição do petróleo

O petróleo bruto e produtos de petróleo são misturas complexas de estruturas variáveis que exibem uma ampla variedade de propriedades físicas. Compreende os compostos de hidrocarbonetos (responsável por 50-98% do total da composição) e os compostos sem hidrocarbonetos (contendo enxofre, nitrogênio, oxigênio e vários metais traços) (Tyagi *et al.*, 2011) em uma ampla gama de combinações (Clark e Brown, 1977). Principalmente formado de alcanos de cadeia linear e de cadeia ramificada, os cicloalcanos e os aromáticos. Algumas das principais características como: substância oleosa, inflamável, odor característico e a cor variando entre o negro e o castanho escuro, podem ser citados para este composto (Vecchia 2010).

Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser divididos em quatro diferentes classes: os saturados, os aromáticos, os asfaltenos (fenóis, ácido graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e as resinas (pirimidinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas). (Colwell *et al.*, 1997).

A classe dos hidrocarbonetos saturados inclui alcanos de cadeia linear (alcanos normais), alcanos ramificados (isoalcanos) e os cicloalcanos (naftalenos). São normalmente os maiores constituintes em óleos crus e possuem uma cadeia de 1 a 40 carbonos. As formas mais comumente encontradas nesses hidrocarbonetos são o C19 (pristano) e C20 (fitano), e estes são formados por unidades repetidas de C5 (isopreno) (Balba *et al.*, 1998; Killops e Killops, 2005).

A fração aromática inclui compostos aromáticos monocíclicos, como o benzeno, tolueno e xileno, e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs, *Polycyclic aromatic hydrocarbons*), os quais possuem dois ou mais anéis aromáticos (Killops e Killops, 2005; Zhu *et al.*, 2001).

Na fração pesada do petróleo, estão compreendidas as resinas e os asfaltenos. Formados por compostos polares de nitrogênio, enxofre e oxigênio, possuem estruturas químicas complexas com elevada condensação de anéis aromáticos, incluindo alguns constituintes organometálicos (complexos com vanádio e níquel associados) (van

Hamme *et al.*, 2003; Balba *et al.*, 1998; Killops e Killops 2005). Na Figura 1, pode ser observada a estrutura de alguns desses compostos.

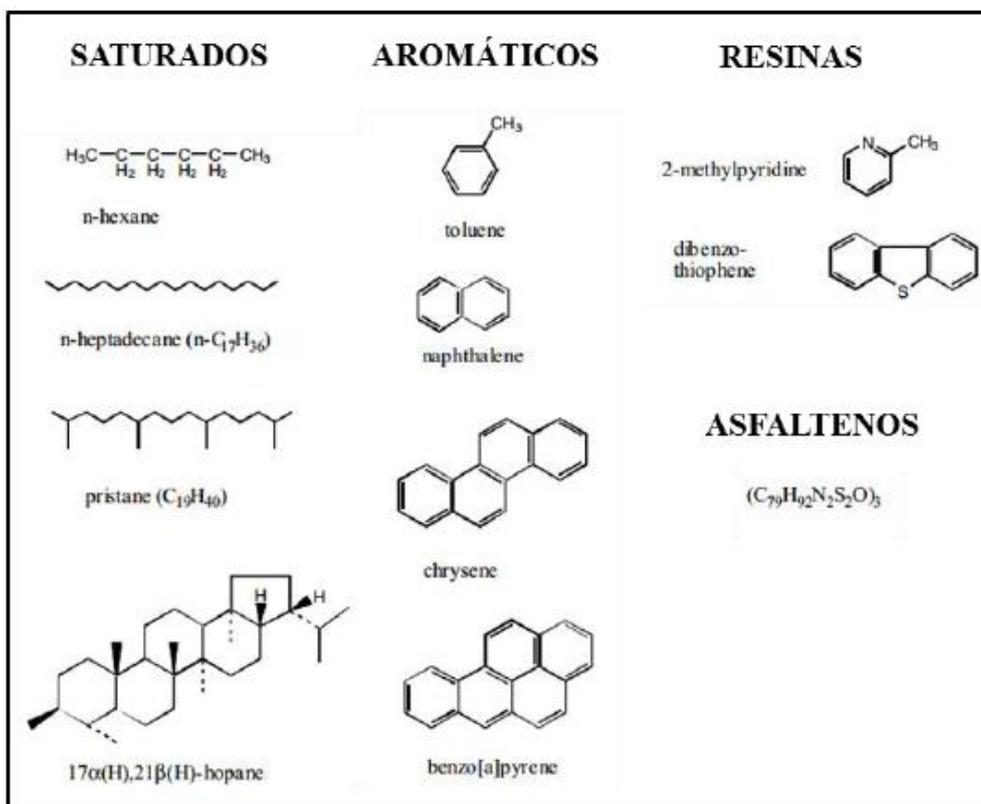


Figura 1: Principais compostos orgânicos encontrados em óleo cru. Fonte: adaptado de Zhu *et al.* (2001).

Dentre os compostos orgânicos inclusos nos hidrocarbonetos de petróleo, os PAH apresentam propriedades tóxicas, cancerígenas, teratogênicas, mutagênicas e de toxicidade persistente (Balachandran *et al.*, 2012). Consistem em dois ou mais benzenos fusionados e/ou anéis pentacíclicos em arranjos lineares, angulares ou fragmentados (Wilson *et al.*, 1993; Blummer 1976) (Figura 2). Devido à possibilidade de fusão de um grande número variado de anéis aromáticos e das posições que estes se ligam, atualmente, mais de 100 PAHs estão reconhecidos pela IUPAC

(International Union of Pure and Applied Chemistry).

Tabela 1: Nomenclatura, estrutura e efeitos dos 16 PAHs definidos como 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)

Baseado na ecotoxicidade, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) listou 16 PAHs como poluentes prioritários (Liu 2001) (Tabela 1). A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, *International Agency Research on Cancer*) identificou 15 PAHs, incluindo 6 dos 16 PAHs regulados pela USEPA, como potenciais carcinogênicos (Chauan *et al.*, 2008). Por este motivo, estes complexos podem causar uma gama de ameaças para a saúde humana e ambiental, alterando o equilíbrio ecológico (Cohen *et al.*, 2013).

1.2 Produção de petróleo e Acidentes ambientais

O petróleo tornou-se uma das principais fontes de energia do mundo moderno e como consequência, uma crescente demanda pela energia proveniente deste composto tem-se buscado. Dessa maneira, a procura por novos pontos de extração desse recurso foram intensificadas nos últimos tempos.

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o volume de petróleo produzido foi de 86,8 milhões de barris/dia em 2013. O Brasil se situou na 13ª posição no ranking mundial com um volume produzido de 2,1 milhões de barris/dia (2,5% do total global). No acumulado dos últimos 10 anos, o crescimento médio da produção brasileira foi de 3,5% (ANP, 2014).

Atualmente, é um dos mais importantes recursos energéticos e matérias-primas da indústria química. Com a crescente demanda por energia, um grande número de hidrocarbonetos de petróleo contamina o meio ambiente por processos de rotina, tais como exploração, transporte, armazenamento, refino, distribuição e especialmente em derramamentos acidentais (Xu *et al.*, 2013). Aproximadamente 90% das toneladas de petróleo liberadas na água estão diretamente relacionadas com atividades humanas (NAS, 1985). Este número é bastante incerto e pode variar muito de ano para ano, dependendo dos incidentes com derramamentos.

Linhas costeiras marinhas são importantes recursos públicos e ecológicos, servindo como lar de uma variedade de vida selvagem. Os derramamentos de óleo nessas áreas têm gerado grandes ameaças pois, podem causar danos nos ambientes marinhos costeiros. O derramamento de 37 mil toneladas (11 milhões de galões) de petróleo bruto em *Prince William Sound*, Alaska, a partir do navio petroleiro Exxon Valdez, em março de 1989, levou à mortalidade de milhares de aves e mamíferos marinhos, reduzindo significativamente esta população (Spies *et al.*, 1996). Em 1996, o *Sea Empress* lançou cerca de 72 mil toneladas de petróleo bruto e 360 toneladas de óleo combustível pesado em Milfor Haven em South Wales e representou uma ameaça considerável para a pesca local e a vida selvagem (Edwards e White, 1999).

Segundo dados da Federação Internacional de Poluição por Proprietários de Petroleiros (ITOPF, *International Tanker Owners Pollution Federation*), no período de

1970 a 2013, aproximadamente 5,74 milhões de toneladas de óleo foram lançados ao mar apenas por petroleiros (ITOPF, 2014).

A quantidade de óleo presente em um ambiente em decorrência de derramamento de petróleo é diretamente proporcional ao tempo de recuperação desta área e a intensidade deste impacto. Devido a sua característica hidrofóbica, o petróleo forma uma película entre o ar e a água, quando derramado em ambiente aquático (National Research Council, 2003). Os componentes do petróleo, como ditos anteriormente, são extremamente prejudiciais ao bioma nativo. As substâncias tóxicas contidas na sua composição causam impactos físicos e químicos, como a falta de oxigenação da água e a luminosidade inacessível para as algas realizarem fotossíntese devido ao recobrimento pela mancha de óleo (Fellenberg, 1980; Da Silva *et al.*, 2012).

1.3 Técnicas de remediação

Estratégias para limpeza de um derramamento de óleo são muito afetadas por uma variedade de fatores, tais como o tipo de óleo e as características físico-químicas do local onde ocorreu o derramamento. Desta maneira, uma ampla série de abordagens e tecnologias foram desenvolvidas para controlar incidentes com petróleo em ambientes costeiros e ambientes de água doce. Estes métodos têm sido revisados e descritos em vários documentos técnicos tais como: Opções para Minimizar os Impactos Ambientais de Resposta ao Derramamento de Água Doce (*Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response*) (NOAA, 1994), Entendendo Derramamentos de Óleos e Respostas aos Derramamentos (*Understanding Oil Spills and Oil Spill Response*) (U.S. EPA, 1999a) e Respostas aos Derramamentos de Óleos em Ambientes Marinhos (*Oil Spill Response in the Marine Environment*) (Doerffer, 1992). Na Tabela 2 estão contidas algumas técnicas de limpeza para ambientes costeiros.

Tabela 2: Opções convencionais de limpeza da linha costeira

Categoria das Opções de Resposta	Exemplo de Tecnologia
Método Natural	Atenuação Natural
Métodos Físicos	Barreiras Escumadeiras Remoção Manual Remoção Mecânica Lavagem Realocação de sedimentos/Lavagem da superfície Lavrar Queima <i>In situ</i>
Métodos Químicos	Dispersantes Desemulsificantes Solidificadores Químicos de película superficial

Fonte: adaptado de Zhu *et al.* (2001)

1.3.1 Métodos Naturais

Atenuação natural ou recuperação natural é basicamente uma opção de não-ação que permite o óleo ser removido e degradado por meios naturais. Em alguns casos, é mais rentável e ecologicamente correto manter um local contaminado do que tentar intervir com outras técnicas. Um monitoramento é necessário para avaliar o desempenho deste método. Processos que resultam na remoção de óleo incluem: evaporação, foto-oxidação e biodegradação.

- Evaporação: é a mais importante nos estágios iniciais do processo de degradação. Nos derramamentos, remove os componentes mais leves dos óleos e dependendo da composição, podem ser evaporados dentro das primeiras 12 horas da contaminação (USEPA 1999a).
- Foto-oxidação: leva a decomposição de compostos mais complexos a compostos mais simples, tornando-os mais leves em peso e mais solúveis em água, o que permite a remoção por outros processos. Ocorre quando o oxigênio, sob a luz solar, reage com os componentes do óleo.

- Biodegradação: vários tipos de micro-organismos são capazes de oxidar os hidrocarbonetos de petróleo e são amplamente distribuídos na natureza. São extensivamente reconhecidos como substratos para o crescimento microbiano.

1.3.2 Métodos Físicos

A contenção física e a recuperação do óleo livre são as respostas primárias e muito onerosas de alguns países como, por exemplo, os Estados Unidos, nos derramamentos de petróleo em ambientes marinhos e de água doce da linha costeira. Métodos físicos mais usados:

- Barreiras e escumadeiras: a utilização de barreiras para conter e controlar a circulação de óleo flutuante e o uso de escumadeiras para recuperá-lo. Se o tráfego da limpeza é controlado, o impacto ambiental é mínimo.
- Limpeza com materiais absorventes: através da utilização de materiais hidrofóbicos para limpar o óleo da superfície contaminada. Onde, a geração de resíduos é controlada, embora a eliminação destes seja um problema.
- Remoção mecânica: recolhimento e retirada de sedimentos superficiais oleosos usando equipamentos mecânicos. Só deve ser utilizados quando quantidades limitadas precisam ser removidas. Não deve ser considerada para a limpeza de habitats sensíveis.
- Lavagem: lavagem do óleo aderindo ao longo das margens até a beira da água para a coleta. As estratégias de lavagem variam de jatos de água fria de baixa pressão a lavagens de água quente com alta pressão.
- Realocação de sedimentos e lavra: movimento de sedimentos oleosos de uma seção da praia para outra ou lavrando e misturando os sedimentos contaminados para melhorar os processos de limpeza naturais. Facilita a dispersão do óleo na água e promove a interação entre os materiais finos do petróleo e minerais.

- Queima *In situ*: o óleo na linha costeira é geralmente queimado quando está sobre um composto inflamável. Este método pode causar a poluição do ar e destruição significativa de plantas e animais.

1.3.3 Métodos Químicos

Os métodos químicos, principalmente os dispersantes, têm sido rotineiramente usados em muitos países como opções de resposta. No Reino Unido, onde as condições costeiras brutas podem fazer uma resposta mecânica problemática, os dispersantes são a principal escolha (Lessard e Demarco, 2000). Nos Estados Unidos há um desacordo entre a eficácia e as preocupações de toxicidade e efeitos ambientais a longo prazo. Os principais agentes químicos incluem:

- Dispersantes: os agentes dispersantes, que contêm surfactantes, removem o óleo flutuante a partir da superfície da água para dispensá-lo na coluna de água antes do petróleo alcançar e contaminar a linha costeira. Isto é feito para acelerar as taxas de biodegradação do óleo e reduzir os efeitos tóxicos.
- Desemulsificantes: usado para quebrar as emulsões do óleo-em-água melhorando a dispersão natural.
- Solidificadores: produtos químicos que aumentam a polimerização de óleo são utilizados para estabilizá-los, minimizando o espalhamento e aumentando a eficácia das operações de recuperação física.

No entanto, esses processos químicos e físicos são onerosos e resultam em uma descontaminação incompleta do bioma nativo, pois, segundo o Escritório de Avaliação Tecnológica (*Office of Technology Assessment, OTA*) (1990), os métodos mecânicos atuais recuperam cerca de 10-15% do petróleo depois de um derramamento. Desta maneira, processos biológicos, como a biorremediação, são métodos promissores para o tratamento desses ambientes contaminados, pois são considerados seguros, eficientes e mais baratos que outros processos para a remoção de poluentes perigosos (Providenti *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2010).

1.4 Biorremediação

Esta técnica surgiu como uma opção de tratamento muito promissora visto a sua aplicação, com ótimos resultados, na catástrofe com o *Exxon Valdez* em 1989 (Bragg *et al.*, 1994). Ela tem sido definida como o ato de adição de materiais para ambientes contaminados, causando uma aceleração dos processos de biodegradação natural pois, utiliza as atividades metabólicas e fisiológicas dos micro-organismos para descontaminar áreas impactadas. Estes micro-organismos, como bactérias e fungos, obtêm fonte de carbono a partir de compostos orgânicos nocivos à saúde humana e ao ecossistema (Atlas, 1984; Zhu *et al.*, 2001; De Lorenzo, 2008; USEPA, 2012).

O sucesso da biorremediação em derramamentos de óleo depende da habilidade em estabelecer e manter condições favoráveis para que a taxa de biodegradação de petróleo seja reforçada (Prince, 1993). As várias estratégias para essa técnica incluem categorias *in situ* e *ex situ*, onde, nesta primeira categoria, a descontaminação ocorre no próprio local impactado e na segunda, os resíduos são transportados até um local próprio para a remediação, longe da fonte poluidora (Boopathy, 2000).

A biorremediação tem sido provada como uma ferramenta de tratamento de baixo custo, se usada corretamente, na limpeza de certos ambientes contaminados com óleo. Poucos efeitos prejudiciais foram observados em operações de campo (Swannel *et al.*, 1996). Dentre essas técnicas, destacam-se algumas:

- *Biosparging*: processo *in situ* no qual envolve a injeção de ar atmosférico, sob pressão, transferindo os contaminantes da zona saturada para a zona insaturada (superfície), onde o aumento da concentração de oxigênio promove a degradação aeróbia dos compostos orgânicos (Santos, 2007). No solo, nutrientes podem ser injetados, a fim de aumentar a degradação de contaminantes por micro-organismos autóctones (Rizzo *et al.*, 2006). O fluxo de ar não deve ser excessivo a ponto de transferir compostos voláteis para a atmosfera (Khan *et al.*, 2004).
- *Bioventing*: consiste na injeção de ar no solo contaminado na zona não saturada, diferente do *Biosparging*, para maximizar a biodegradação *in situ* e minimizar a volatilização dos contaminantes para a atmosfera (Trindade, 2002). Também favorece a

degradação de contaminantes orgânicos menos voláteis (Rizzo *et al.*, 2006; Santos, 2007).

- Fito-remediação: é um processo baseado na habilidade das plantas absorverem, acumularem e/ou degradarem compostos que estão presentes em solos e em ambientes aquáticos. Existem cinco processos básicos que podem ocorrer: fitoextração (captação do contaminante do solo), rizofiltração (transporte dos contaminantes pelas raízes da planta), fitotransformação (degradação do contaminante pelo metabolismo da planta), fitoestimulação (biorremediação auxiliada pela planta que envolve o estímulo da degradação microbiana pelos micro-organismos presentes na rizosfera) e a fitoestabilização (utiliza plantas para reduzir a migração dos contaminantes pelo solo) (Trindade, 2002; Khan *et al.*, 2004; Santos, 2007). Após o tratamento, a vegetação é colhida e geralmente queimada, o que diminui a contaminação em 95%. É um processo lento e em algumas vezes, as raízes das plantas não atingem a profundidade de toda a contaminação (Oliveira *et al.*, 2006).
- *Landfarming*: é uma tecnologia de remediação *ex situ* que reduz a concentração de componentes do petróleo presentes em solos através de processos associados à biorremediação. Envolve a distribuição do solo contaminado em uma pequena camada na superfície do solo do local de tratamento. Periodicamente, o solo é revolvido para que o contato aumente entre os micro-organismos e os compostos orgânicos e para que haja oxigênio necessário para a degradação aeróbica. Dependendo da taxa de degradação destes hidrocarbonetos, o solo contaminado com petróleo pode ser aplicado no local a intervalos regulares, mantendo a atividade biológica local (Boopathy, 2000; Khan *et al.*, 2004; Santos, 2007). Para melhorar o desempenho, algumas mudanças podem ser realizadas como a correção do pH, umidade e as concentrações dos nutrientes (Nikolopoulou *et al.*, 2013).
- Biopilhas: outra tecnologia de remediação *ex situ* na qual envolve o empilhamento de solos contaminados. Tem como objetivo principal estimular a atividade microbiana aeróbica acelerando a degradação do poluente pela aeração, adição de nutrientes e correção da umidade (Khan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Santos, 2007). A aeração destas pilhas pode ser realizada de duas maneiras: mecanicamente ou por um sistema subterrâneo de passagem de ar. Frequentemente, as pilhas são cobertas para prevenir a

perda por evaporação, volatilização e manutenção da temperatura (Khan *et al.*, 2004). As biopilhas têm muito sucesso na remediação de ambientes contaminados por compostos orgânicos, em especial, na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Jorgensen *et al.*, 2000). Porém, estes compostos são voláteis ou semivoláteis tendem a evaporar ao invés de biodegradar e por isto, esse vapor gerado requer um tratamento anterior ao descarregamento.

- Bioestimulação: é umas das estratégias mais adotadas em processos de recuperação de áreas impactadas e consiste na correção das concentrações nutricionais (nitrogênio, fósforo, potássio), de aeração, de umidade e de pH do solo, para aumentar a atividade da população existente nas áreas contaminadas (Atlas, 1981; Lin *et al.*, 1999; Trindade, 2002; Bento *et al.*, 2005). A manutenção da concentração ótima de oxigênio é importante, tendo em vista que a recuperação dos solos contaminados por petróleo é principalmente baseada em processos aeróbicos, cujas etapas iniciais de degradação dos hidrocarbonetos envolvem a oxidação de substratos pelas enzimas oxigenases (Boopathy, 2003). O nitrogênio é primariamente utilizado para o crescimento celular, ou comoceptor alternativo de elétrons, sendo comum o uso de meios com ureia, cloreto de amônio e nitrato de amônio, por serem fontes importantes deste elemento (Boopathy, 2000; Zhu *et al.*, 2001).
- Bioaugmentação e Bioenriquecimento: são estratégias que visam auxiliar a concentração da microbiota do ambiente contaminado na degradação de misturas complexas de hidrocarbonetos com a adição de uma concentração maior de micro-organismos específicos e degradadores para este tipo de contaminante. Esta técnica pode ser aplicada para aumentar a biodegradação do composto poluente e reduzir o tempo de adaptação dos micro-organismos presentes nesses ambientes contaminados. Quando ocorrer reinoculação de micro-organismos endógenos (extraídos do próprio solo contaminado, crescidos *in vitro* e reintroduzidos no ambiente em maior concentração), a técnica é denominada como bioaugmentação. Se os micro-organismos inoculados forem exógenos, é chamado de bioenriquecimento (Providenti *et al.*, 1993; Romantschuk *et al.*, 2000). No entanto, alguns autores adotam o termo de bioaugmentação para ambos os casos (Vogel, 1996; Moreira e Siqueira, 2002). São relatados na literatura vários sucessos de aplicação destas técnicas em ambientes contaminados. Na revisão realizada por Leahy e Colwell (1990), foi descrito que a adição de bactérias no solo acelerou a

taxa de degradação de pesticidas. Smith *et al.* (1997) obtiveram um aumento da biodegradação de misturas de PAHs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) após a inoculação do solo com um consórcio composto por bactérias degradadoras.

A escolha da tecnologia de biorremediação mais apropriada a ser aplicada deve levar em consideração algumas características, tais como as propriedades físico-químicas do solo, umidade, pH, microbiota natural e, não menos importante, a natureza do contaminante (Santos, 2007). Produtos leves de petróleo como a gasolina tendem a ser removidos durante a aeração por evaporação visto que eles contêm compostos orgânicos voláteis (VOCs) e os produtos de peso molecular médio como diesel ou querosene contêm baixas quantidades de componentes voláteis, sendo a biodegradação mais efetiva. Porém, combinações mais pesadas de óleo de aquecimento e lubrificantes não evaporam, assim a combinação da biodegradação com outras metodologias pode ser necessária (Khan *et al.*, 2004; Santos, 2007).

Diversos autores têm utilizado estas técnicas para o tratamento de ambientes contaminados com compostos orgânicos, entretanto, há controvérsias na literatura sobre qual a estratégia de remediação seria mais eficiente (Alexander, 1999; Gentry *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2009).

Na literatura, bactérias do gênero *Acromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cornybacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Vibrio* e os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Trichoderma* já foram descritos que possuem capacidade de degradação de hidrocarbonetos (Leahy e Colwell, 1990; Balba *et al.*, 1998; Bento *et al.*, 2005).

1.5 Disponibilização dos Contaminantes e Produção de Biossurfactantes

A baixa disponibilização de muitos contaminantes, encontrados em solos e ambientes aquáticos, é um dos principais fatores que interfere no processo de biodegradação pelos micro-organismos. A inabilidade destes em entrar em contato com os poluentes pode vir a interferir negativamente nas taxas de remediação, mesmo se forem capazes de degradar os contaminantes presentes no sistema (Providenti *et al.*, 1993). Vários autores indicam que a baixa solubilidade destes compostos pode

influenciar o crescimento microbiano, e dessa maneira, a biodegradação dos hidrocarbonetos (Providenti *et al.*, 1993; Alef e Nannipieri, 1995; Boopathy, 2000). De maneira geral, quanto maior a solubilidade do contaminante em água, mais biodegradável esse será (Banerji *et al.*, 1995). Dessa maneira, a presença de surfactantes, sintéticos ou biológicos, torna estes compostos disponíveis aos micro-organismos.

Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas, pois apresentam uma porção hidrofílica (um açúcar ou peptídeo) e uma porção hidrofóbica (cadeia de ácido graxo) na mesma estrutura, com propriedades que têm sido exploradas para uma variedade de aplicações para a biorremediação. Estes facilitam a disponibilidade dos hidrocarbonetos para os micro-organismos, aumentando efetivamente a taxa de degradação.

Estes componentes biológicos que podem ser produzidos por uma ampla variedade de leveduras, bactérias e fungos filamentosos (Chen *et al.*, 2007; Mata-Sandoval *et al.*, 199,200), a partir de várias substâncias incluindo açúcares, óleos e resíduos, podem ser considerados como coadjuvantes na degradação de hidrocarbonetos pesados (RahMan e Gakpe, 2008; Whang *et al.*, 2008). Podem ser agrupados em dois grandes grupos: moléculas de baixo peso molecular, que diminuem a tensão superficial e interfacial, e moléculas de alto peso molecular, que estabilizam as emulsões óleo em água (van Hamme *et al.*, 2006).

Surfactantes sintéticos são amplamente empregados em uma variedade de aplicações, entretanto, essas moléculas químicas apresentam alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiências em pH e temperatura específicos (Desai e Banat, 1997). Devido à toxicidade dessas moléculas, quando utilizadas na remediação ambiental, representam uma fonte adicional de contaminação. Devido a isto, o uso de surfactantes biológicos, de origem microbiana, se mostrou interessante para o processo de biorremediação (Cameotra e Singh, 2008).

Como mostra a Figura 3, a parte hidrofílica faz com que os surfactantes se

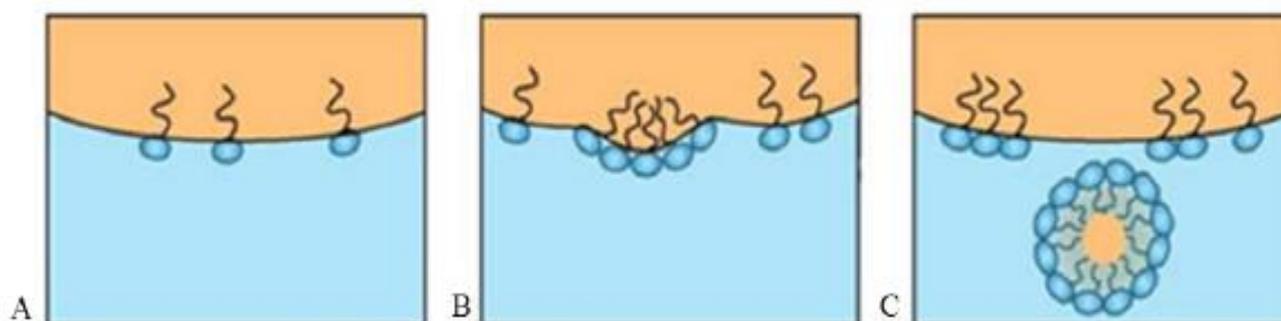


Figura 3: Mecanismo de solubilização de hidrocarbonetos dentro de micelas de surfactantes. (A) quando a concentração de hidrocarbonetos aumenta e o espaço disponível diminui, os surfactantes tendem a se organizar e se agregar (B) até um ponto chamado de “concentração micelar crítica” (CMC), onde micelas são formadas capturando o contaminante para seu centro hidrofóbico. (C) Uma vez disperso, os hidrocarbonetos se tornam mais disponíveis para absorção pelas células. Fonte: Perfumo et al. (2010).

solubilizem em água, enquanto a parte hidrofóbica faz com que eles se concentrem na interface.

A atividade dos biossurfactantes depende da concentração de componentes da superfície até que a concentração micelar crítica (CMC) seja obtida. Em concentrações acima do CMC, essas moléculas tensoativas se associam para formar micelas, bicamadas e vesículas (Figura 4) (Whang *et al.*, 2008). A formação de micelas permite que os biossurfactantes reduzam a tensão superficial e interfacial resultando num aumento da solubilidade e da biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos (Whang *et al.*, 2008). A CMC é comumente utilizada para medir a eficiência do

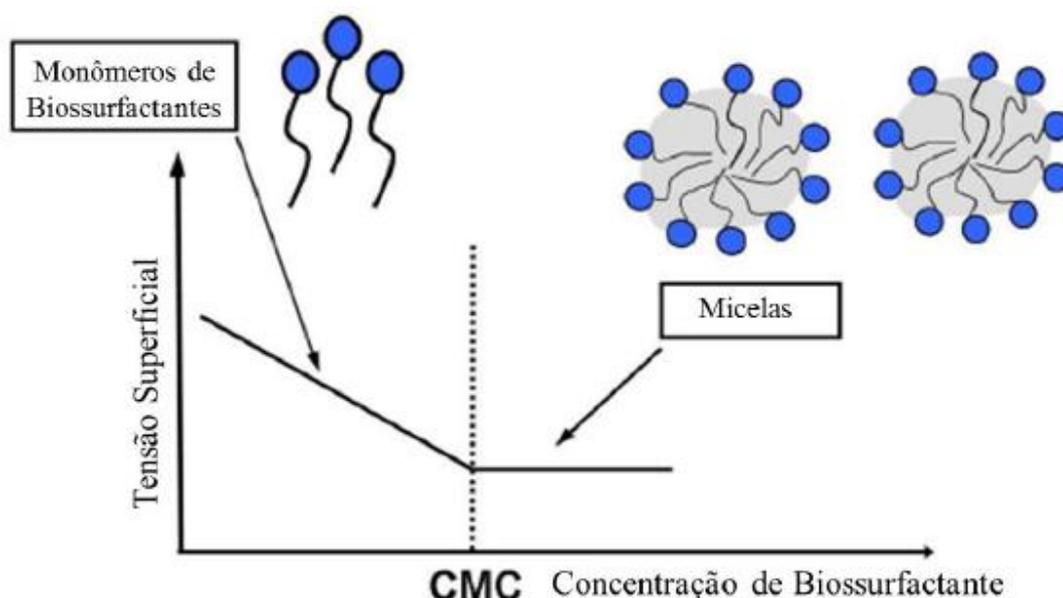


Figura 4: Esquema de relação entre a concentração de biossurfactante, tensão superficial e a formação de micelas. Fonte: adaptado de Pacwa-Plociniczak *et al.* (2011).

surfactante e é definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação micelar (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Logo, biossurfactantes eficientes possuem um baixo valor de CMC, o que significa que é necessário menos tensoativos para diminuir a tensão superficial (Desai e Banat, 1997).

A efetividade de um biossurfactante é determinada pela medição da sua capacidade em alterar as tensões superficiais e interfaciais, estabilização de emulsões e o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, *hydrophilic-lipophilic balance*). Este valor é uma maneira de indicar a aplicabilidade adequada de um biossurfactante. Emulsificantes

com baixo HLB são lipofílicos e estabilizam a emulsificação água-em-óleo, enquanto que moléculas com alto HLB possuem um efeito oposto e conferem uma melhor solubilidade em água (Desai e Banat, 1997; Christofi e Ivshina, 2002).

Portanto, existe um crescente interesse na utilização de biossurfactantes para tratamentos de biorremediação, e já estão descritos na literatura diversos microorganismos produtores desta substância para este tipo de processo, reforçando o papel destes na aceleração da degradação de contaminantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial de degradação de petróleo pela ação de micro-organismos em ambientes contaminados.

2.2 Objetivos específicos

- a.** Avaliar a capacidade degradativa de micro-organismos por teste com indicadores redox TTC e 2,6-DCPIP na presença de diferentes concentrações de petróleo;
- b.** Verificar quais destes micro-organismos tem maior capacidade de degradar e solubilizar petróleo em água marinha;
- c.** Determinar a produção de biossurfactantes pelos micro-organismos selecionados;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da amostra

Para o desenvolvimento deste estudo, a amostra de petróleo foi fornecida pela REFAP – Refinaria Alberto Pasqualini, localizada em Canoas – Rio Grande do Sul, Brasil. A água marinha utilizada nos experimentos foi coletada no município de Xangri-lá – RS, na localidade de Marina-Maristela.

3.2 Micro-organismos

Para este trabalho, 209 micro-organismos foram utilizados a partir da coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica situado no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

3.3 Utilização do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Teste prévio para avaliar a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. A técnica utilizada baseia-se no método de Braddock e Catteral (1999), com algumas alterações realizadas pelo grupo de pesquisa deste projeto. Os experimentos foram realizados em placa de 96 poços (Greiner) com volume total de 300 μ L por poço, onde foi adicionado o meio mineral (MM1) (Apêndice A1) previamente autoclavado por 15 min a 120°C, e adicionado de 20% de solução de TTC filtrado com membrana estéril de 0,22 μ m. Após a mistura, o pH do meio foi ajustado para 7,0. Um inóculo de micro-organismos foi acrescido (10^6 células) com posterior adição de petróleo (1, 5 e 10%). Para o controle negativo, não houve adição de micro-organismo.

A placa foi recoberta com papel alumínio para evitar a foto-oxidação do indicador redox, por ser muito sensível, evitando resultados falso-positivos. A incubação ocorreu a 30°C por sete dias com homogeneização periódica em vórtex. O experimento foi

monitorado nos tempos 24, 48 e 168 horas onde se observava a coloração de cada amostra.

3.4 Utilização do indicador 2,6-DCPIP

No segundo teste preliminar, o 2,6-Diclorofenol indofenol (2,6-DCPIP) foi utilizado. Este é um indicador de oxi-redução que detecta a oxidação de NADH para NAD^+ e está relacionado à degradação de hidrocarbonetos por micro-organismos (Kubota *et al.*, 2008). A técnica foi realizada em placa de 96 poços (Greiner) com adição do meio mineral com o DCPIP (adaptado de Hanson *et al.*, 1993) em cada poço com posterior acréscimo dos isolados testados (10^6 células), e por fim, o petróleo foi incluso nas concentrações 1, 5 e 10% num volume reacional final de 300 μL . A placa foi incubada a 30°C por sete dias com homogeneização periódica. Foi também recoberta com papel alumínio para evitar a foto-oxidação do indicador. Os tempos 24, 48 e 168 horas foram selecionados para observação da mudança de coloração.

A cor do meio e a forma da gota de petróleo foram avaliadas, como positivas os micro-organismos que diminuíram a cor do meio e a quantidade do hidrocarboneto, e negativa para os meios que se mantiveram na coloração azulada (Hanson *et al.*, 1993).

3.5 Teste em placa contendo água marinha para a seleção de micro-organismos degradadores de petróleo

Um terceiro teste foi realizado em placas de polipropileno de 24 poços (fabricante) com meio de cultivo contendo água marinha, previamente filtrada, e petróleo em três concentrações diferentes. Foi preparado um pré-inóculo inicial de 24 horas em YPD líquido (2% de peptona, 2% de glicose e 1,5% de extrato de levedura) para cada micro-organismo testado. Duas lavagens das células com água destilada estéril foram realizadas com posterior ressuspensão em 5 mL de água marinha para ambientação das células. Com uma densidade óptica de 0,8 padronizada a 600 nm, os micro-organismos foram inoculados em cada poço contaminado com 1, 5 e 10% de petróleo. As amostras permaneceram incubadas em *shaker* sob agitação de 90 rpm por

um período de 7-14 dias a 30°C. Para os controles negativos, não houve adição de micro-organismo.

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

3.6 Avaliação da produção de biossurfactantes

Para a avaliação da produção de biossurfactantes, foram realizadas duas análises diferentes: teste do azul de metileno e índice de emulsificação para cada micro-organismo selecionado dos testes anteriores.

3.6.1 Teste colorimétrico com azul de metileno

Para a seleção dos micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes do tipo ramnolipídeos, o teste do azul de metileno foi reproduzido, com base no método de Siegmund e Wagner (1991).

Os isolados foram inoculados, sob forma de estria, 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, 0,065% de azul de metileno, 1% de brometo cetiltrimetilamonio e 1,5% de ágar. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e o experimento foi observado nos tempos de 1, 7 e 14 dias. Como indicativo de resultado positivo, a formação de halo amarelado ao redor das colônias resulta na produção deste tipo de biossurfactante.

3.6.2 Índice de emulsificação

A medida do percentual do índice de emulsificação em 24h ($IE_{24h}\%$) foi realizada com base em Cooper e Goldenberg (1987), para verificar a formação de biossurfactantes de alto peso molecular produzidos pelos micro-organismos. Os isolados foram previamente crescidos em meio YPD líquido 24 horas antes do experimento a 30°C. Duas lavagens com água destilada estéril foram realizadas para a

retirada do excesso do meio rico. A verificação deste índice foi realizada em amostras com ausência de células (retiradas por centrifugação a 8000 rpm por 6 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 horas a temperatura ambiente. Após esse período, o IE_{24h}% foi calculado através da seguinte fórmula:

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise inicial para avaliação de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos com o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Esta técnica tem como finalidade avaliar, de forma qualitativa e rápida, a metabolização de hidrocarbonetos por micro-organismos. Por ser um método eficiente e simples, têm sido muito utilizada para triagem de possíveis novos candidatos na degradação de óleos (Olga *et al.*, 2008). Seu princípio baseia-se na reação de oxidação com o indicador, tornando-o um acceptor artificial de elétrons quando o micro-organismo utiliza hidrocarbonetos como fonte de carbono devido à reação aeróbica (Braddock e Catteral, 1999; Richard e Vogel 1999). Alguns outros fatores como nitratos, nitritos e ferro (III) funcionam como aceptores artificiais de elétrons alternativos e podem influenciar a atividade da desidrogenase (Balba *et al.*, 1998). Logo, o objetivo desta análise é determinar se os micro-organismos, selecionados previamente da coleção do laboratório, eram capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo. Os experimentos foram monitorados nos períodos 24, 48 e 168 horas. De 209 micro-organismos testados anteriormente, 46 foram selecionados e novamente testados frente às diferentes concentrações de contaminante: 19 foram classificados como degradadores de hidrocarbonetos na concentração de 1%, 20 micro-organismos para 5% e 17 micro-organismos para 10% como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Relação de micro-organismos selecionados a partir de diferentes concentrações de contaminantes. Os poços foram avaliados quanto a coloração e comparados ao controle negativo. As concentrações de 1, 5 e 10% de contaminantes foram utilizadas.

Micro-organismo (Sigla)	1%			5%			10%		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
48e		+	+		+	+		+	+
E9a			+			+			+
Ma12c			+			+			
Ma23c			+			+			+
Ma44a			+			+			+
Ma47a			+			+			+
Ma65b			+			+			+

Ma70b		+			+		
RR49	+	+		+	+		+
RR50		+			+		
RR74	+	+		+	+		+
RR120		+			+		+
RR132		+			+		+
RR214		+			+		+
RR233		+			+		+
RR244	+	+		+	+		+
RR267		+			+		+
15PP	+	+		+	+		+
24PP				+	+	+	+
QU34	+	+		+			+

+ indica modificação na coloração do MM1

O indicador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) incolor e solúvel em água, quando entra em contato com micro-organismos que são capazes de degradar óleo para utilização de fonte de carbono, reage com os elétrons liberados, e reduz a trifenilformazan (TPF) de coloração rosácea pela ação da desidrogenase (Casida, 1977; Olga *et al.*, 2008). Foram constatadas diferenças no comportamento de cada micro-organismo quanto a sua intensidade na coloração do meio e o período de incubação, sendo assim, houve diferenças nos tempos de consumo dos hidrocarbonetos de petróleo e talvez, uma maior intensidade de degradação entre alguns isolados selecionados.

Dentre estes, apenas o isolado 24PP nas concentrações de 5 e 10%, modificou a coloração do meio mineral no tempo de 24 horas indicando a degradação de hidrocarbonetos nos períodos iniciais. No tempo de 48 horas, os isolados 48e, RR49, RR74, RR244, 15PP e QU34 modificaram a coloração do meio para as três concentrações de contaminantes. Para os outros 14 isolados foi observada a mudança de coloração no tempo de 168 horas, sendo que três destes (Ma12c, Ma70b e RR50) não tiveram indicação de oxidação microbiana na concentração de 10%. De modo geral, a quantidade de contaminante não afetou o número de micro-organismos degradadores, indicando que estes, podem possuir grande capacidade de degradação ou resistência a outras concentrações mais altas de petróleo. A Figura 5 mostra o resultado final de um dos testes realizados. Em círculos pretos estão alguns dos micro-organismos selecionados, nas três condições, para as próximas análises.

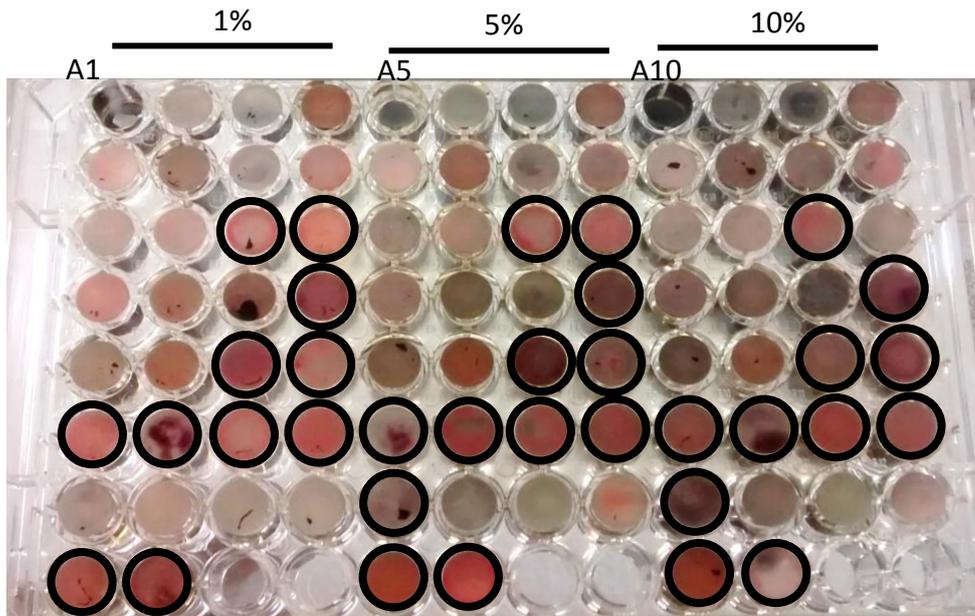


Figura 5: Teste realizado com indicador redox TTC, com vista inferior da placa de 96 poços, demonstrando os isolados selecionados no período de 168 horas. Nos poços A1, A5 e A9 estão os controles negativos (sem adição de inóculo). Cada poço corresponde a um micro-organismo e este testado para as três concentrações na mesma placa.

Com os resultados obtidos a partir deste teste qualitativo, os micro-organismos selecionados (43%), foram capazes de oxidar a fonte de carbono em tempos mais longos e isso pode ser explicado devido à complexidade da estrutura do petróleo (Leahy and Colwell, 1990), levando um período maior para que estes metabolizem os hidrocarbonetos.

4.2 Indicador 2,6-Diclorofenol indofenol (DCPIP)

A segunda técnica utilizada pode detectar com sensibilidade, e de forma qualitativa, a oxidação primária de hidrocarbonetos, sendo adequada para avaliar e investigar isolados com potencial degradador de petróleo (Kubota *et al.*, 2008). Este ensaio tem sido utilizado para o rápido e simples isolamento de micro-organismos degradadores de óleo cru (van Hamme *et al.*, 2000). Durante a oxidação microbiana, elétrons são transferidos para aceptores, tais como O₂, nitratos e sulfatos (Hutchins *et al.*, 1991). Com a incorporação de um aceptor de elétrons como o DCPIP, é possível determinar se o micro-organismo utiliza o hidrocarboneto como substrato observando a

mudança da cor azulada deste indicador, no estado oxidado, para incolor, no seu estado reduzido (Hanson *et al.*, 1993).

De todos os micro-organismos testados nas três diferentes concentrações de contaminante, para a concentração de 1%, quatro isolados indicaram diminuição na coloração do meio e/ou mudança na forma do petróleo no período de 24 horas, cinco em 48 horas e vinte e um no final das 168 horas. Para as concentrações de 5 e 10%, o número de micro-organismos positivos para o teste diminuiu, e isso pode ser explicado pela alta quantidade de hidrocarbonetos colocados no teste. Mesmo assim, nove isolados foram selecionados. Para esta análise, a concentração do óleo dificulta a interpretação do resultado, entretanto, na literatura chegam a usar até 2% (v/v) de contaminante com resultados satisfatórios (Isola *et al.*, 2013). Dentro dessas modificações apresentadas pelos isolados, alguns apenas alteraram a cor do meio e outros reduziram a gota de petróleo adicionada, indicando que utilizaram-o como fonte energética.

Tabela 4: Relação dos micro-organismos selecionados com o período de incubação com a concentração de contaminante para o teste com o indicador DCPIP. As concentrações de 1, 5 e 10% de contaminantes foram utilizadas.

Micro-organismo Sigla	1%			5%			10%		
	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h	24 h	48 h	168 h
33d			+ *						
39a			+ *						
48e			+ *						
Ma23c			+ *						
Ma47b			+ *						
Ma64c	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VR138	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VR242			+ *						
RR23			+ *						
RR46	+	+ *	+ *			+			
RR49			+ *						
RR50		+ *	+ *			+			
RR84			+						
RR120			+ *						
RR132			+			+			
RR233			+ *			+			
RR244			+ *			+			

RR267											+	*		
QU31													+	*
QU33													+	*
QU34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ indica viragem do meio *indica modificação na gota de petróleo

Na Tabela 4 estão apresentados os isolados selecionados a partir dos resultados obtidos para as três concentrações de contaminantes, indicando se houve a mudança de cor ou a redução da gota do óleo. Os micro-organismos Ma64c e VR138 se destacaram e se apresentaram positivos para as três concentrações desde o primeiro tempo de incubação (24 horas). Os isolados 33d, 39a, 48e, Ma23c, Ma47b, VR242, RR23, RR46, RR49, RR50, RR120, RR233, RR244, RR267, QU31 e QU33 modificaram a gota de petróleo, reduzindo-a parcialmente ou completamente em alguns casos, como é apresentado na Figura 6. A cor do poço também foi verificada e foram selecionados aqueles que modificaram a coloração azulada (estado oxidado) para rosáceo/esbranquiçado (estado reduzido).

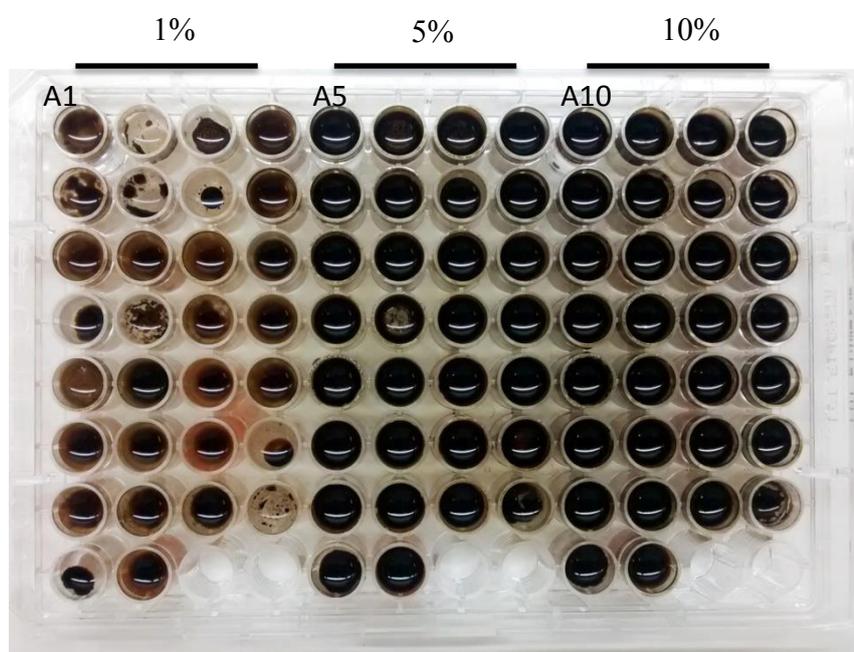


Figura 6: Teste realizado com o indicador DCPIP, em placa de 96 poços, no período de 168 horas. Os controles negativos estão nos poços A1, A5 e A9. Vista superior da placa. Cada poço corresponde a um isolado e este testado para as três concentrações de contaminante.

Alguns resultados desta análise corroboram com os resultados do indicador redox-TTC, visto que os micro-organismos Ma23c, RR49, RR50, RR120, RR132, RR233, RR244, RR267 e QU34 foram positivos para as duas técnicas prévias. Outros isolados se mostraram positivos apenas para este segundo teste, enquanto outros somente se mostraram eficazes com o primeiro indicador. Dessa maneira, mais técnicas foram necessárias para comprovar que estes isolados poderiam ser utilizados como biorremediadores para ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

4.3 Teste em placa com água marinha

Visto que os isolados se mostraram possíveis metabolizadores de hidrocarbonetos com os testes prévios anteriores, estes foram submetidos a uma nova avaliação visual para observar o potencial de degradação. Nesta técnica, o micro-organismo foi inoculado em um meio contendo água marinha natural e petróleo (em três concentrações de contaminante). Após quatorze dias, uma análise visual sobre a degradação e a solubilização da mancha de petróleo foi empregada.

Para a concentração de 1% de petróleo, 22 micro-organismos foram selecionados como promissores. No período de 168 horas, QU31, Ma47b, 48e, RR84, RR267, RR41e RR214 reduziram a mancha de petróleo de forma expressiva. Porém, no período de 336 horas, os isolados RR48, RR244, RR71 e RR132 apresentaram o início de uma possível degradação e redução do contaminante. Já o micro-organismo QU33, foi o único onde todo o meio havia evaporado, restando apenas o petróleo. Para alguns

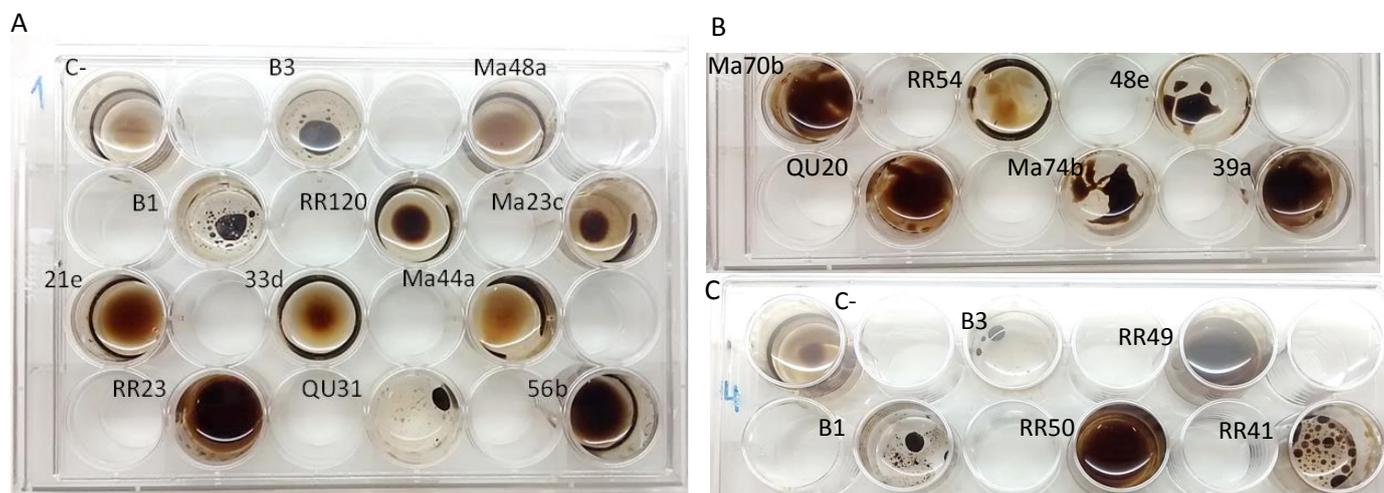


Figura 7: Resultados do teste com água marinha em placa de 24 poços com a concentração de 1% de contaminante no período de 168 horas em agitação. (A) RR23, QU31 e 56b (B) 48e, QU20, Ma47b e 39a. (C) RR41, RR49 e RR50 selecionados

isolados como o RR23, 56b, QU20 e 39a, RR49 e RR50, foi notado uma dispersão da gota de petróleo, indicando que está ocorrendo solubilização para este substrato como mostra a Figura 7.

Nas análises com 5 e 10% de petróleo, só foi possível observar mudança na mancha de petróleo após 336 horas. Isto pode ser explicado devido à maior concentração de contaminante na análise, pois, é mais difícil os micro-organismos degradarem os hidrocarbonetos em altas proporções nas horas iniciais.

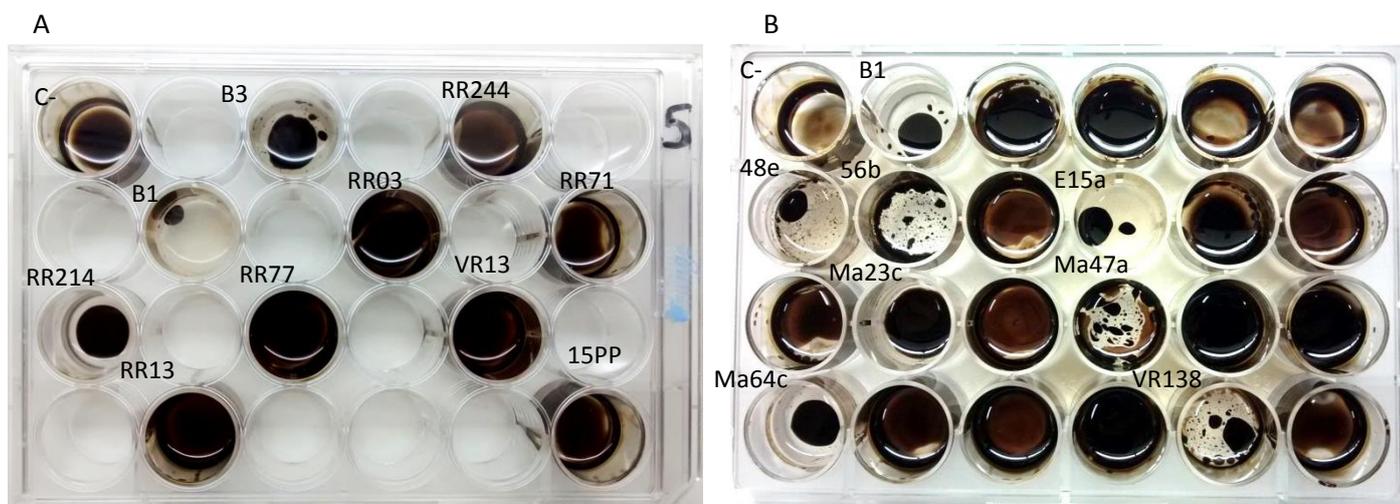


Figura 8: Placas de 24 poços na concentração de 5% de petróleo no período de 336 horas. (A) o isolado RR214 modificou o contaminante quando comparado com o controle negativo e os controles positivos B1 e B3. (B) os micro-organismos 48e, 56b, E15a, Ma23c, Ma47a, Ma64c e VR138 se apresentaram expressivos na degradação ao final desse período.

Com estes resultados (Figura 8), é possível concluir que os isolados selecionados deste teste podem ser utilizados como estratégias de remediação, bioaugmentação e bioestimulação, para ambientes contaminados (Bento *et al.*, 2005). Estes micro-organismos passaram para outras análises com o intuito de confirmar esta propriedade.

4.4 Avaliação da produção de biosurfactantes

Uma das principais vantagens do emprego dos bioemulsificantes ou biosurfactantes (normalmente glicolipídeos) é a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada eficácia em algumas situações. O uso dos surfactantes é um

método promissor de disponibilização dos contaminantes à atividade microbiana, principalmente quando empregado em associação com tecnologias de tratamento *ex situ* (Providenti *et al.*, 1993).

Dessa maneira, foi avaliada a produção de biossurfactantes com o propósito de selecionar micro-organismos atuantes no processo de biorremediação.

4.4.1 Teste colorimétrico com azul de metileno

Primeiramente, foi analisada a capacidade de produção de ramnolipídeos. A técnica utilizada foi criada para selecionar biossurfactantes glicolipídicos contendo ramnose produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Siegmund e Wagner 1991). Estes compostos contêm um ou dois anéis de ramnose ligados a um ou dois ácidos graxos do tipo β -hidroxi de diferentes comprimentos de cadeia (Figura 9) (Zgoła-Grzeškowiak and Kaczorek 2011; Linhardt *et al.*, 1989). As várias combinações destes grupos podem gerar um grande número de moléculas semelhantes, entretanto, ramnolipídeos com dois ácidos graxos e uma ou duas ramnososes representam 90% de todos os tipos existentes (Déziel *et al.*, 1999).

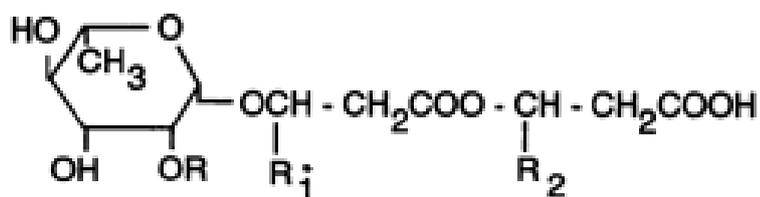


Figura 9: Estrutura de um ramnolipídeo. Em um monoramnolipídeo, R = H ou R = CO-CH=CH-(CH₂)₆-CH₃; em um diramnolipídeo, R = ramnosil ou R = ramnosil-O-CO-CH=CH(CH₂)₆-CH₃. R1 e R2 = C₇H₁₅

A utilização destas substâncias ocasionou várias vantagens em comparação aos surfactantes sintéticos, tais como: valores baixos de concentração micelar crítica (Wang *et al.*, 2007), possibilidade de produzir biossurfactantes *in situ*, baixo impacto ambiental, alta biodegradabilidade e uma elevada eficiência na solubilização (Chrzanowski *et al.*, 2012). Acredita-se, que estas moléculas devem desempenhar um papel mediador entre os micro-organismos que vivem hidrofílicos no ambiente com os hidrocarbonetos hidrofóbicos insolúveis em água. Modificações das propriedades da

superfície das células microbianas pelos ramnolípídeos conduzem a um aumento da área de contato entre a fonte de carbono e as células (Zhang e Miller, 1995). Sua habilidade de formar emulsões e solubilizar componentes imiscíveis na água os torna adequados para várias aplicações industriais e biotecnológicas (Costa *et al.*, 2010).

O exato papel fisiológico dos ramnolípídeos ainda não está determinado, entretanto, já foi descrito que promovem o crescimento microbiano em *n*-alcanos líquidos (Shreve *et al.*, 1995) e o quão são efetivos na remoção de metais pesados do solo (Miller 1995). A secreção de ramnolípídeos levaria a solubilização de compostos hidrofóbicos, contribuindo na estimulação de processos de biodegradação (Hisatsuka *et al.*, 1971). Por ser considerado como uma característica integral de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, alguns pesquisadores ligam a falta de genes responsáveis pela síntese de ramnolípídeos com a incapacidade de crescer em fontes de carbono hidrofóbicas (Ochsner *et al.* 1994).

Desta maneira, podemos afirmar que a técnica de produção de ramnolípídeos é amplamente utilizada para avaliar a eficácia de micro-organismos em metabolizarem os hidrocarbonetos de petróleo. Porém, de todos os isolados testados, apenas os isolados RR71 (Figura 10A) e RR46 (Figura 10B), tiveram halo indicativo para a produção deste tipo de surfactante no período de 168 horas.

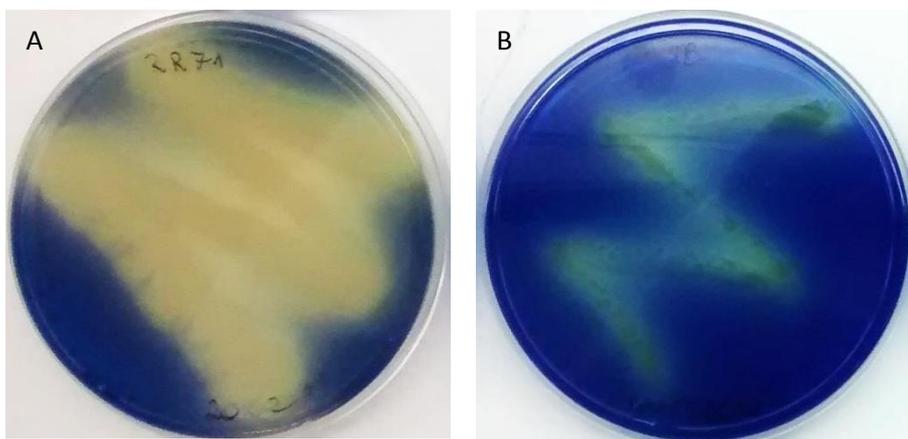


Figura 10: Resultado do teste colorimétrico para produção de ramnolípídeos. (A) RR71 e (B) RR46

4.4.2 Determinação do índice de emulsificação

A medida do Índice de Emulsificação ($IE_{24h}\%$) tem como finalidade avaliar a produção de biossurfactantes de alto peso molecular, os bioemulsificantes. Estes são mais eficazes que os polímeros de baixo peso molecular na formação e estabilização de óleo em água ou emulsões de água em óleo, mas não necessariamente reduzem a tensão superficial (Gudiña *et al.*, 2015). Usualmente, consistem em estruturas poliméricas incluindo polissacarídeos, proteínas, lipídeos e complexos dessas moléculas. De todos os biossurfactantes a produção de bioemulsificantes é a menos estudada, entretanto, já foi descrita em diferentes bactérias (Rosenberg *et al.*, 1979; de Sousa e Bhosle 2012), leveduras (Amaral *et al.*, 2006) e fungos filamentosos (Luna-Velasco *et al.*, 2007). Essas moléculas possuem um alto grau de compatibilidade ambiental, visto que são menos tóxicas, biodegradáveis e possuem atividades emulsificantes similares quando comparadas com seus homólogos químicos (Franzetti *et al.*, 2012).

Os bioemulsificantes podem ser produzidos como uma estratégia de adaptação dos micro-organismos na presença de contaminantes hidrofóbicos por terem um papel coadjuvante no processo de biodegradação. Por este motivo, com o intuito de verificar a produção destas moléculas ligadas à parede celular dos micro-organismos e/ou liberados extracelularmente (visto em sobrenadante, na ausência de células), a técnica de emulsificação foi utilizada. Nas Figuras 11 e 12 estão apresentados o $IE_{24h}\%$ dos isolados selecionados na presença e na ausência de células respectivamente.

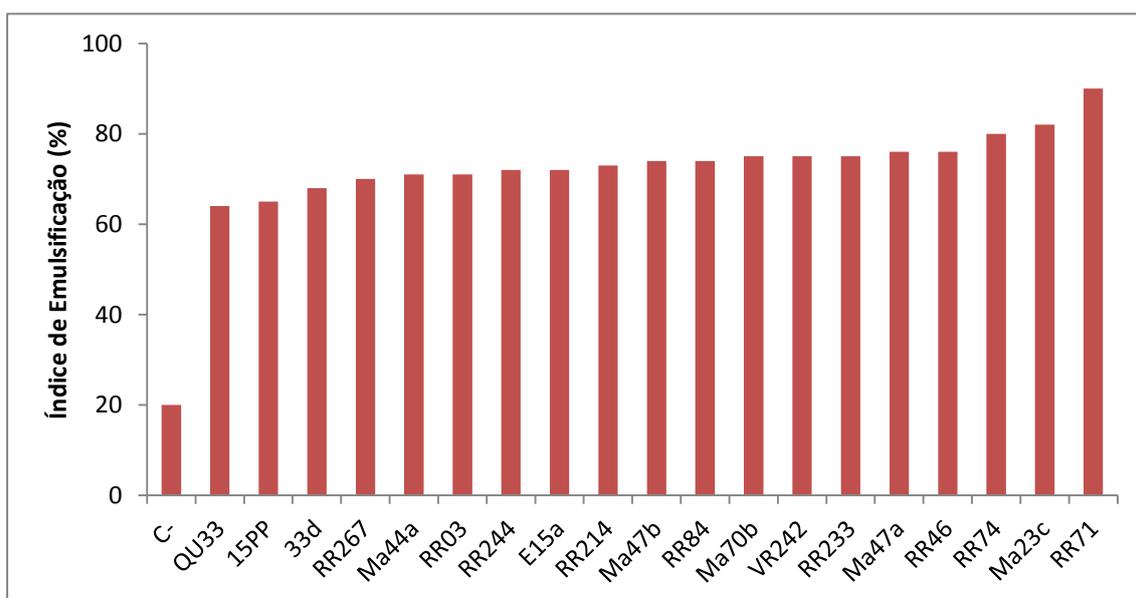


Figura 11: Índice de emulsificação dos micro-organismos selecionados após retirada do excesso de meio rico com presença de células. C- = controle negativo.

Dos 33 micro-organismos analisados e selecionados a partir dos testes anteriores, 19 foram escolhidos (Figura 11), utilizando um ponto de corte de acima de 60% de emulsificação. Para o controle negativo, foi utilizado um micro-organismo da coleção do laboratório que não produz biossurfactantes. Dentre os testados, o maior produtor foi o isolado RR71 com 90% de produção. Os resultados obtidos foram elevados quando comparados ao controle negativo, sugerindo a presença de bioemulsificantes na parede celular dos isolados.

Quando analisamos a produção de biossurfactantes secretados (Figura 12), também foi observado elevados níveis de emulsificação, indicando que alguns desses isolados conseguem secretar e disponibilizar para o meio estas moléculas emulsificantes. Com este teste, 16 micro-organismos foram selecionados com um ponto de corte acima de 20%. Comparando com o controle negativo, os isolados 15PP e o QU31 obtiveram os valores mais altos do IE_{24h}% com 70 e 75% respectivamente.

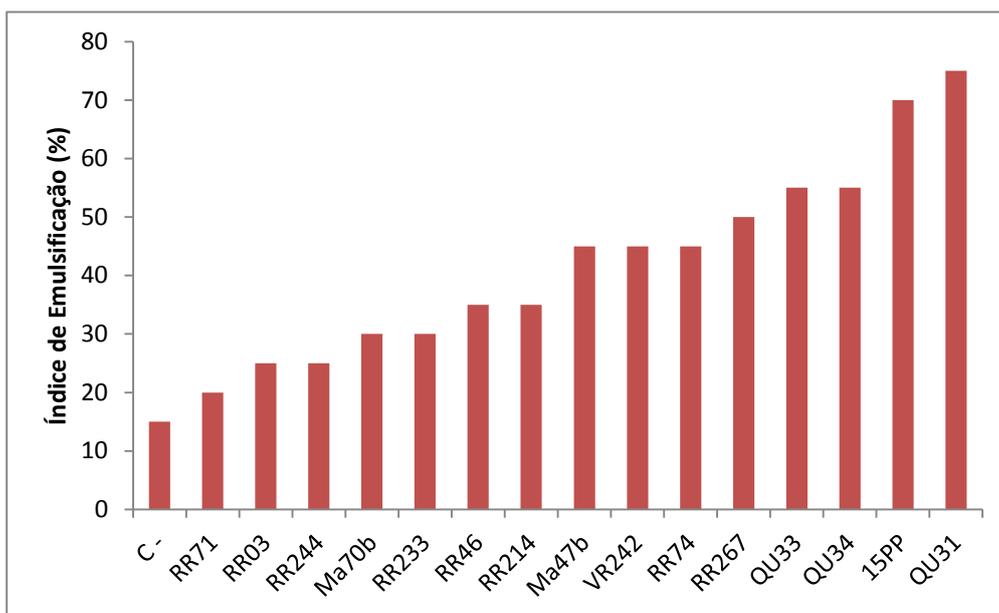


Figura 12: Índice de Emulsificação do sobrenadante, ausência de células, dos micro-organismos testados. O meio rico em excesso foi retirado e lavado com água destilada estéril. C- = controle negativo.

Estes resultados comprovam a produção de bioemulsificantes pelos micro-organismos testados, tanto extracelularmente quanto ligados à parede celular. Na literatura está descrito que há uma grande variação nas capacidades de emulsificação. A produção desses biossurfactantes auxilia no aumento da degradação e na utilização dos

hidrocarbonetos de petróleo pelos micro-organismos (Bento *et al.*, 2008). Dessa maneira, os isolados que foram selecionados, são promissores para remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Após todas essas metodologias, 19 micro-organismos se apresentaram como promissores na degradação e na utilização do petróleo para obtenção de carbono e energia. Entretanto, mais testes serão necessários para comprovar que estes isolados podem ser usados como remediadores para o tratamento de ambientes contaminados.

Como perspectivas para o trabalho pretende-se:

- a. Avaliar a Tensão Superficial;
- b. Verificar a produção de metabólitos e a viabilidade celular num ensaio de biorremediação para cada isolado;
- c. Identificação molecular dos micro-organismos mais promissores;
- d. Avaliação da biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo por Cromatografia Gasosa (GC).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. e NANNIPIERI, P. In: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. *Academic Press*, 1st ed., 576 p (1995).

ALEXANDER, M. In: Biodegradation and Bioremediation. *Academic Press*, 2nd ed., San Diego, U.S.A., 453p (1999).

AMARAL PFF, SILVA JM, LEHOCKY M, BARROS-TIMMONS AMV, COELHO MAZ, MARRUCHO IM, COUTINHO JAP. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 2006;41:1894–8.

ANP. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2014. Rio de Janeiro: 2014.

ATLAS, R. M. (ed.) (1984) Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York.

ATLAS, R.M. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1): 180-209 (1981).

BALACHANDRAN, C., DURAIKANDIYAN, V., BALAKRISHNA, K., 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.* (2012), pp. 83–90

BALBA, M. T; AL-AWADHI N; AL-DAHER R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods*, 32 (1998), pp 155-164.

BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C.L., GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J. e MORGAN, R. T. In: Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors. U.S. Army Corps of Engineers, Washington, DC, october, 61p, (1995).

- 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. Biosurfactantes. 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.
- BLUMER M (1976) Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci American* 234:35–45
- BOOPATHY, R. (2003) Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 161 – 166.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.
- 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.
- BRAGG, J.R., PRINCE, R.C., HARNER, E.J., AND ATLAS, R.M. (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368, 413-418.
- BUSHNELL LD, HAAS HF. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *J Bacteriol*. 1941 May; 41(5):653-73.
- CAMEOTRA, S. S. e SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, n. 3, p. 274-280, 2008.
- CASIDA, L. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and environmental microbiology*, v. 34, n. 6, p. 630-636, 1977.
- 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.

CHEN, S. Y., Y.H, WEI AND J.S. CHANG, 2007. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 76 (1): 67-74.

CHRISTOFI, N., IVSHINA, IB: Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol* 2002, 93(6):915-929.

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. AND BROWN, D. W. (1977) Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems. In Malins (Ed) Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Environments and Organisms Vol. 1. *Nature and Fate of Petroleum*. Academic Press, Inc., New York, pp-1-89.

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.

COLWELL, R. R., AND J. D. WALKER. 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:423-445.

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.

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.

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

DE SOUSA T, BHOSLE S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresour Technol.* 2012 Nov; 123():256-62.

DESAI, J. D. AND 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. and 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.

DOERFFER, J.W. (1992) *Oil Spill Response in the Marine Environment*, Pergamon Press, Oxford, U.K.

EDWARDS, R. AND WHITE, I (1999) The Sea Empress oil spill: environmental impact and recovery Proceedings of 1999 International Oil Spill Conference. *American Petroleum Institute*, Washington DC.

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

FRANZETTI A, GANDOLFI I, RAIMONDI C, BESTETTI G, BANAT IM, SMYTH TJ, PAPACCHINI M, CAVALLO M, FRACCHIA L. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. *Bioresour Technol*. 2012 Mar; 108():245-51.

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.

GUDIÑA, E. J., PEREIRA, J. F., COSTA, R., EVTUGUIN, D. V., COUTINHO, J. A., TEIXEIRA, J. A., & RODRIGUES, L. R. (2015). Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. *Microbial Cell Factories*, 14, 14. doi:10.1186/s12934-015-0197-5

HANSON KG, DESAI JD, DESAI AJ (1993) A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol Tech* 7:745-748

HISATSUKA KT, NAKAHARA T, SANO N, YAMADA K. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agric Biol Chem.* 1971;35:686–692. doi: 10.1271/bbb1961.35.686.

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.

HUTCHINS, S.R., SEWELL, G.W., KOVACS, D.A. and SMITH, G.A. Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 68-76, 1991.

ISOLA D, SELBMANN L, DE HOOG GS, FENICE M, ONOFRI S, FX, PRENAFETA-BOLDÚ, ZUCCONI L. Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile aromatic hydrocarbons. *Mycopathologia.* 2013.

ITOPF. International Tanker Owners Pollution Federation Limited. USA 2014

JØRGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.-M. (2000) Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107: 245-254.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71: 95–122

KUBOTA, K., KOMA, D., MATSUMIYA, Y., CHUNG, S. Y., & KUBO, M. (2008). Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. *Biodegradation*, 19, 749–757.

LEAHY, J.G. e COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment. *Microbiological Reviews*, 54 (3):305-315 (1990).

LI, L.; CUNNINGHAM, C.J.; PAS, V.; PHILP, J.C.; BARRY, D.A.; ANDERSON, P. (2004) Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile. *Waste Management*, 24: 127–137.

LIN, Q., MENDELSSOHN, I.A, HENRY JR, C.B, ROBERTS, P.O, WALSH, M.M., OVERTON, E.B. e PORTIER, R.J. Effects of bioremediation agents on oil degradation

in mineral and sandy salt marsh sediments. *Environmental Technology*, 20:825-837 (1999).

LINHARDT, T. J., R. BAKHIT, L. DANIELS, R. MAYERL, AND W. PICKENHAGEN. 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose. *Biotechnol. Bioeng.* 33:365-368.

LIU K (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal fired pilot FBC system. *J Hazard Mater* 84: 175–188

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..

LUNA-VELASCO MA, ESPARZA-GARCÍA F, CAÑIZARES-VILLANUEVA RO, RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochem.* 2007;42:310–4.

MILLER, R.M. 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.*, 103, pp. 59–62

MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras: Editora. UFLA, Brasil (2002).

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (1985) Oil in the Sea: Inputs, Fates and Effects, National Academy Press, Washington DC.

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.

NOAA and API (1994) Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response, National Oceanic & Atmospheric Administration and American Petroleum Institute.

OCHSNER UA, KOCH AK, FIECHTER A, REISER J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1994 Apr; 176(7):2044-54.

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.

PATTANATHU K.S.M. RAHMAN and EDWARD GAPKE, 2008. Production, characterisation and applications of biosurfactants-review. *Biotechnology*,7: 360-370.

PRINCE, R.C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.* 19, 217-242.

PROVIDENTI, M. A., LEE, H. e TREVORS, J. T. (1993). Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, 12:379-395 (1993).

RICHARD, J. Y. and 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.

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.

ROMANTSCHUK, M., SARAND, I., PETÄNEN, T., PELTOLA, R., JONSSONVIHANNE, M., KOIVULA, T., YRJÄLÄ, K. e HAAHTELA, K. Means to Improve The Effect of In Situ Bioremediation of Contaminated Soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*, 107:179- 185 (2000).

ROSENBERG E, ZUCKERBERG A, RUBINOVITZ C, GUTNICK DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol.* 1979 Mar; 37(3):402-8.

SANTOS, R.M. Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo/ Renata da Matta dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

SHREVE, G.S., INGUVA, S., GUNNAM, S. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, 4 (1995), pp. 331–337

SIEGMUND I, WAGNER F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol Tech* 5:265–268

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.

SMITH, M.J., LETHBRIDGE, G. e BURNS, R.G. Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. *FEMS Microbiology Letters*, 152:141-147 (1997).

SPIES, R.B., RICE, S.D., WOLFE, D.A., WRIGHT, B.A. (1996) The effect of the Exxon Valdez oil spill on Alaskan coastal environment, Proceedings of the 1993 Exxon Valdez Oil Spill Symposium, American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp1-16.

SWANNELL, R.P.J., LEE, K., AND MCDONAGH, M. (1996) Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*, 60(2), 342-365.

TRINDADE, P.V.O. (2002). Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.

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 (1999a) Understanding oil spills and oil spill response, EPA 540-K-99-007, Office of Emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency.

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 HAMME JD, ODUMERU JA, WARD OP (2000) Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. *Can J Microbiol* 46:441–450

VAN HAMME JD, SINGH A, WARD OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:503–549.

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.

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

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*, 7:311-316 (1996).

WANG Q, FANG X, BAI B, LIANG X, SHULER PJ, GODDARD WA, III, TANG Y. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng*.2007;98(4):842–853. doi: 10.1002/bit.21462.

WHANG L-M, LIU P-WG, MA C-C, CHENG S-S (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J Hazard Mater* 151:155–163

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.

WILSON SC AND JONES KC (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynucleararomatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Poll* 81:229–249

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.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK A, KACZOREK E. Isolation, preconcentration and determination of rhamnolipids in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2011;83(3):744–750.

ZHANG Y, MILLER RM. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61:2247–2251.

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.

APÊNDICES

A1. Meio Mineral (MM1)

Solução A	Para 1 litro
KCl	0,7 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
NaHPO 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