

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ASSOCIAÇÕES MICROBIANAS COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS  
PARA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO**

**Amanda Pasinato Napp**

Tese 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 Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, agosto de 2018.

O presente 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 contou com fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Parte deste trabalho foi realizada no “Laboratorio de Biodegradación y Biomedicación” situado no “Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona” em Barcelona na Espanha. Com bolsa de doutorado sanduiche financiada pela CAPES - Ciências do Mar II (Processo número: 88882.158709/2017-01).

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Marilene Henning Vainstein, pelo apoio e acessibilidade, desde o mestrado, e, além disso, por acreditar na minha capacidade ao longo do projeto desenvolvido;

À minha co-orientadora, Professora Fátima Mnenezes Bento, pela confiança, oportunidade e ensinamentos durante esse percurso;

À Professora Magdalena Grifoll, por ter me acolhido em seu laboratório e, por ser um exemplo de pesquisadora, o qual contribuiu muito para o meu crescimento profissional;

Aos professores, Alexandre Macedo e Lucymara F. Agnez-Lima, membros da comissão de acompanhamento;

Às professoras, Maria C. R. Peralba, Lucymara F. Agnez-Lima e Luciane M. P. Passaglia, por me receberem em seus laboratórios e, por disponibilizarem toda a estrutura e espaço necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores, Augusto Schrank, 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;

Ao colega e amigo, Msc. José Evandro S. Pereira, que iniciou essa jornada comigo desde o primeiro dia e que, sempre se mostrou preocupado e interessado, o qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, uma pessoa que admiro pela força de vontade e determinação;

Ao aluno de iniciação científica, Renê Gabriel pelo auxílio e comprometimento durante todo o transcorrer deste trabalho;

A colega e amiga, Msc. Sara N. Jiménez-Volkerink, pelo companheirismo e paciência depositados em mim, e por todos os ensinamentos, os quais foram imprescindíveis para meu crescimento profissional;

Aos colegas, Dr. Jorge S. Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Rita C. B. Silva-Portela, que contribuíram e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários da secretaria do PPGBCM, pela disponibilidade e auxílio nas dúvidas que surgiam;

Aos amigos e colegas dos laboratórios 217, 219 e 220 pela convivência diária e profissionalismo, e que de alguma maneira contribuíram e auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu primo e irmão, Kaynã Batista Gonçalves, que sempre esteve presente me ajudando a encarar as mudanças da minha vida pessoal e profissional, o qual compartilha uma casa comigo e que me ensinou o verdadeiro significado de amizade e companheirismo;

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;

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

À agência de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

*“Happiness is only real when shared.”*

*Christopher McCandless*

*(Alexander Supertramp)*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 A indústria petroquímica.....	14
1.2 Constituintes do petróleo .....	15
1.3 Contaminação ambiental por hidrocarbonetos do petróleo e tecnologias de remediação .....	18
1.4 Biodegradação de compostos orgânicos .....	22
1.4.1 Mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos .....	29
1.4.2 Mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .	33
1.5 Aplicação de consórcios microbianos na remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos .....	37
1.6 Ferramentas moleculares empregadas na microbiologia do petróleo .....	38
2 OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivos Específicos.....	42
3 RESULTADOS .....	43
3.1 Capítulo I: Comparative Metagenomics Reveals Different Hydrocarbon Degradative Abilities from Enriched Oil-Drilling Waste .....	44
3.2 Capítulo II: Seleção e caracterização de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo .....	65
3.2.1 INTRODUÇÃO .....	66
3.2.2 METODOLOGIA .....	69
3.2.2.1 Obtenção das Amostras .....	69
3.2.2.2 Isolamento de microrganismos.....	69
3.2.2.3 Seleção de microrganismos com capacidade de utilização de hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono .....	71
3.2.2.4 Avaliação da biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs).....	71
3.2.2.4.1 Biodegradação de creosota e hexadecano.....	72
3.2.2.4.2 Biodegradação de fenantreno e hexadecano .....	73
3.2.2.4.3 Biodegradação de petróleo bruto .....	73
3.2.2.5 Produção de biossurfactantes .....	74
3.2.2.5.1 Índice de emulsificação .....	74
3.2.2.5.2 Colapso da Gota.....	75
3.2.2.5.3 Espalhamento do óleo.....	75
3.2.2.5.4 Tensão superficial.....	76
3.2.2.6 Identificação molecular .....	76
3.2.2.7 Análise filogenética .....	78
3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
3.2.3.1 Obtenção de microrganismos a partir de resíduo de perfuração de poço de petróleo e seleção preliminar de microrganismos com capacidade de utilizar hidrocarbonetos.....	78
3.2.3.2 Avaliação da biodegradação de hexadecano e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) presentes na creosota.....	82

3.2.3.3	Avaliação da biodegradação de hexadecano e fenantreno .....	83
3.2.3.4	Avaliação da biodegradação de petróleo bruto .....	84
3.2.3.5	Avaliação de produção de biossurfactantes por CRN BL8 .....	87
3.2.3.6	Identificação molecular do microrganismo CRN BL8 e análise filogenética.....	90
4	DISCUSSÃO GERAL .....	94
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	104
6	PERSPECTIVAS .....	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
8	APÊNDICES .....	119
9	CURRICULUM VITAE RESUMIDO.....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AH1</b>	<b>Alcano-hidroxilases tipo 1</b>
<b>AH2</b>	<b>Alcano-hidroxilases tipo 2</b>
<b>ANP</b>	<b>Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis</b>
<b>BioSurfDB</b>	<b>Banco de Dados de Biodegradação e Biossurfactantes</b>
<b>BH</b>	<b>Bushnell-Haas</b>
<b>C1,2O</b>	<b>1,2-Catecol Dioxigenases</b>
<b>C2,3O</b>	<b>2,3- Catecol Dioxigenases</b>
<b>C5</b>	<b>Isopreno</b>
<b>CG-FID</b>	<b>Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chamas</b>
<b>CMC</b>	<b>Concentração Micelar Crítica</b>
<b>CYP153</b>	<b>Citocromo P450</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilenodiamino tetra-acético</b>
<b>EPS</b>	<b>Substância polimérica extracelular</b>
<b>g/dm</b>	<b>Gramas por decímetro</b>
<b>g/kg</b>	<b>Gramas por kilograma</b>
<b>GLP</b>	<b>Gás Liquefeito de Petróleo</b>
<b>IE</b>	<b>Índice de Emulsificação</b>
<b>LabFIMB</b>	<b>Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica</b>
<b>LB</b>	<b><i>Luria-Bertani</i></b>
<b>LBE</b>	<b><i>Luria-Bertani enrichment</i></b>
<b>MEGAN</b>	<b><i>MEtaGenome ANalyzer</i></b>



<b>MG-RAST</b>	<i>Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology</i>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>mN/m</b>	<b>MiliNewton por metro</b>
<b>m/v</b>	<b>Massa por volume</b>
<b>NCBI</b>	<b>Centro Nacional de Informação Biotecnológica</b>
<b>NGS</b>	<b>Sequenciamento de próxima geração</b>
<b>PDE</b>	<i>Potato dextrose enrichment</i>
<b>P3,4O</b>	<b>3,4-Protocatecol Dioxigenase</b>
<b>P4,5O</b>	<b>4,5-Protocatecol Dioxigenase</b>
<b>PAH</b>	<b>Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase</b>
<b>PD</b>	<i>Potato Dextrose</i>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrogênio iônico</b>
<b>pmol</b>	<b>Picomol</b>
<b>rDNA</b>	<b>DNA ribossômico</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotação por minuto</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil-sulfato de sódio</b>
<b>TCA</b>	<b>Ciclo do Ácido Cítrico</b>
<b>TPH</b>	<b>Hidrocarbonetos Totais de Petróleo</b>
<b>TRASPETRO</b>	<i>Petrobras Transporte S.A</i>
<b>TS</b>	<b>Tensão Superficial</b>
<b>USEPA</b>	<b>Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos</b>
<b>UCM</b>	<b>Mistura complexa não resolvida</b>

**UHPLC-HRMS**      **Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada à**  
**Espectrometria de Massa de Alta Resolução**

**YPD**                      ***Yeast Peptone Dextrose***

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Composição e estrutura dos componentes mais representativos do petróleo bruto. ....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Degradação aeróbica e anaeróbica de compostos orgânicos por microrganismos. Aeróbica (azul) e anaeróbica (amarelo). Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Processos de captação de hidrocarbonetos pela célula microbiana. (A) Utilização de compostos orgânicos solubilizados. (B) Adesão de células microbianas por contato direto com a fonte hidrofóbica. (C) Absorção por contato direto com hidrocarbonetos dispersos em microgotículas. (D) Absorção de hidrocarbonetos através da produção de biosurfactantes. Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Formação de micelas por moléculas tensoativas quando em contato com compostos hidrofóbicos em meio aquoso.....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Degradação aeróbica de hidrocarbonetos alifáticos por microrganismos. Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).	<b>30</b>
<b>Figura 6.</b> Principais etapas de degradação de hidrocarbonetos aromáticos sob condições aeróbicas. Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Degradação fúngica de compostos aromáticos pela ação de mono-oxigenases. Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Biodegradação de hexadecano e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) presentes na creosota. Porcentagem de degradação de hexadecano (5 g/L) e PAHs (5 g/L) após 21 dias de remediação em meio líquido BH a 30 °C e 200 rpm. Dados referentes às médias ( $\pm$ SD) das triplicatas. Experimento normalizado com Benzo[b]fluoranteno.	<b>83</b>
<b>Figura 9.</b> Biodegradação de hexadecano e fenantreno. Porcentagem de degradação de hexadecano (5 g/L) e fenantreno (5 g/L) após 21 dias de remediação em meio líquido BH a 30 °C e 200 rpm. Dados referentes às médias ( $\pm$ SD) das triplicatas.	<b>84</b>
<b>Figura 10.</b> Cromatograma da fração de hidrocarbonetos alifáticos presentes no petróleo CasaBlanca. Porcentagem de biodegradação de petróleo bruto (5 g/L) após 45 dias de incubação em meio líquido BH a 30 °C e 200 rpm. (A) Controle negativo (abiótico) e (B) Biodegradação com inóculo da CRN BL8. Dados referentes às médias ( $\pm$ SD) das triplicatas. ISO: compostos isoprenóides.....	<b>85</b>
<b>Figura 11.</b> Análise filogenética baseada em sequências do gene 16S rDNA do gênero Rhodococcus. Alinhamento utilizando o programa CLUSTAL Omega. Método de Maximium Parsimony, com valores de bootstrap (1000).....	<b>91</b>

## RESUMO

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos (alifáticos, aromáticos, poliaromáticos) que apresenta elevado poder energético, e por isso, se tornou uma das principais fontes de energia do mundo. Considerando a variedade de matérias-primas geradas a partir deste recurso, o número de poços de extração tem aumentado de forma exponencial, assim como, o volume de resíduos procedentes deste processo. Em decorrência disto, existe uma crescente preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos e terrestres por hidrocarbonetos provenientes do petróleo e seus derivados. O gerenciamento de áreas contaminadas é considerado um grande desafio e neste sentido, estratégias de biorremediação surgem como uma importante alternativa na redução dos impactos ambientais. Estas estratégias são baseadas na utilização de microrganismos nativos ou exógenos com capacidade degradadora e na otimização dos nutrientes necessários para o metabolismo total dos poluentes. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo formular consórcios microbianos e analisar genes envolvidos em processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, além de isolar microrganismos com capacidade de metabolizar estes compostos. Para isto, um resíduo de perfuração de poço de petróleo foi utilizado como inóculo para enriquecimento microbiano em dois meios de cultura diferentes Luria-Bertani (LB) e Potato Dextrose (PD). Após o período de incubação (21 dias), o DNA total destas amostras foi sequenciado utilizando a plataforma Ion Torrent. Análises das sequências metagenômicas, foram realizadas através do programa MG-RAST e posteriormente analisadas pelo banco de dados BioSurfDB, revelando diferentes composições taxonômicas e habilidades funcionais entre os dois enriquecimentos microbianos obtidos (LBE e PDE). Os resultados obtidos a partir destas análises sugerem potencial atividade de biodegradação para hidrocarbonetos alifáticos (50,5% e 44,6%) e aromáticos (46,4% e 37,9%), pelos consórcios LBE e PDE, respectivamente. O mesmo resíduo também foi utilizado para cultivo de microrganismos em *Yeast Peptone Dextrose* (YPD), Bushnell-Haas (BH) e Água marinha natural, para caracterizar o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por microrganismos isolados. Assim, foram isolados 109 microrganismos a partir de todos os cultivos utilizados neste trabalho (LB, PD, YPD, BH e Água marinha). Microrganismos provenientes da Coleção de Biodegradação do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica também foram utilizados, totalizando 115 isolados. Os isolados foram submetidos a testes preliminares em Agar BH contendo concentrações crescentes de hidrocarbonetos (0,03 a 2%). Análises por cromatografia gasosa (GC) foram realizadas para avaliar a porcentagem de biodegradação dos diferentes hidrocarbonetos e selecionar os isolados mais promissores. Ao final destes experimentos, o microrganismo *Rhodococcus* sp. demonstrou capacidade de degradar a maior parte dos hidrocarbonetos presentes no petróleo bruto. Análises filogenéticas sugerem que *Rhodococcus* sp. é potencialmente uma nova espécie. Os resultados obtidos neste trabalho, contribuem para o melhor entendimento dos processos de degradação e apresentam aplicações microbianas eficientes para a remediação de hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

Petroleum is a mixture of hydrocarbon (aliphatic, aromatic, polyaromatic) that has high energy power, and therefore has become one of the main sources of energy in the world. Considering the variety of raw materials generated from this resource, the number of extraction wells has increased exponentially, as well as the volume of waste proceeded from this process. As a result, there is increasing concern about the contamination of aquatic and terrestrial environments by hydrocarbons from petroleum and its derivatives. The management of contaminated areas is considered a great challenge and, in this sense, bioremediation strategies appear as an important alternative in reducing the environmental impacts. The strategies are based on the use of native or exogenous microorganisms with degrading capacity and the optimization of the nutrients necessary for the total metabolism of pollutants. In this context, the present work aims to formulate microbial consortia and analyze genes involved in hydrocarbon degradation processes, besides isolating microorganisms with the capacity to metabolize these compounds. For this, an oil drilling waste was used as an inoculum for microbial enrichment in two different culture media Luria-Bertani (LB) and Potato Dextrose (PD). After the incubation period (21 days), the total DNA of these samples was sequenced using the Ion Torrent platform. Analysis of the metagenomic sequences were performed using the MG-RAST program and later analyzed by the BioSurfDB database, which revealed different taxonomic compositions and functional abilities between the two microbial enrichments obtained (LBE and PDE). The results demonstrated efficient biodegradation capacity for aliphatic hydrocarbons (50.5% and 44.6%) and aromatics (46.4% and 37.9%), by LBE and PDE consortia, respectively. The same residue was also used to culture the microorganisms in Yeast Peptone Dextrose (YPD), Bushnell-Haas (BH) and Natural marine water with the aim to characterize the biodegradation potential of aliphatic and aromatic hydrocarbons by isolated microorganisms. Therefore, 109 microorganisms were isolated from all the cultures used in this work (LB, PD, YPD, BH and Seawater). Also, microorganisms from the Biodegradation Collection of the Laboratory of Fungi of Medical and Biotechnological Importance were used, totalizing 115 isolates. The isolates were subjected to preliminary tests on BH Agar containing increasing concentrations of hydrocarbons (0.03 to 2%). After this, analyzes of gas chromatographic (GC) were made to evaluate the percentage of biodegradation of different hydrocarbons and to select the most promising isolates. At the end of these experiments, the microorganism *Rhodococcus* sp. demonstrated better ability to reduce most of the hydrocarbons present in crude oil. Phylogenetic analyzes have demonstrated that *Rhodococcus* sp. is potentially a new lineage. The results obtained in this work contribute to a better understanding of degradation processes and present efficient microbial applications for the remediation of hydrocarbons.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A indústria petroquímica

O petróleo é uma mistura de compostos resultante de uma série de transformações biológicas, químicas e físicas, que ocorreram com a matéria orgânica, ao longo de milhões de anos. Durante o processo de formação do petróleo compostos orgânicos que estão dispostos no ambiente, juntamente com minerais provenientes do solo, se acumulam por soterramento progressivo e/ou migração formando as reservas petrolíferas. Para que isso aconteça é necessária a presença de rochas sedimentares originalmente abundantes em material orgânico e insolúveis em água, as quais formam o querogênio; esse é submetido a elevadas condições de temperatura e pressão, ocasionando a formação da maior parte dos hidrocarbonetos que compõe o petróleo (HUC et al., 2011; SPEIGHT, 2014; SPIGOLON et al., 2015).

Devido ao seu alto potencial energético, durante o século XX, a constante procura por poços de petróleo aumentou de forma exponencial, tornando esse recurso natural a principal fonte de energia do mundo. Desta forma, a indústria petroquímica se transformou em um dos setores mais importantes e influentes da atualidade, com grande impacto no âmbito político e econômico, impulsionando o desenvolvimento de diversos países (JAFARINEJAD, 2017a; SPEIGHT, 2014).

O principal objetivo da indústria petroquímica é a transformação do petróleo bruto na maior diversidade de produtos possíveis, com o menor custo associado e a maior qualidade. Entre os principais produtos do refinamento desse composto destacam-se: parafina, gás liquefeito de petróleo (GLP), produtos asfálticos, querosene, polímeros,

solventes, óleos combustíveis, óleos lubrificantes, óleo diesel e combustível para aviação (JAFARINEJAD, 2017a; MÜLLER, 2007, 2009; VANDECASTEELE; JONES, 2008a).

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2018), a produção de petróleo no mundo tem apresentado crescimento anual sendo que em 2017, o volume mundial de petróleo produzido foi de 92,649 milhões de barris/dia.

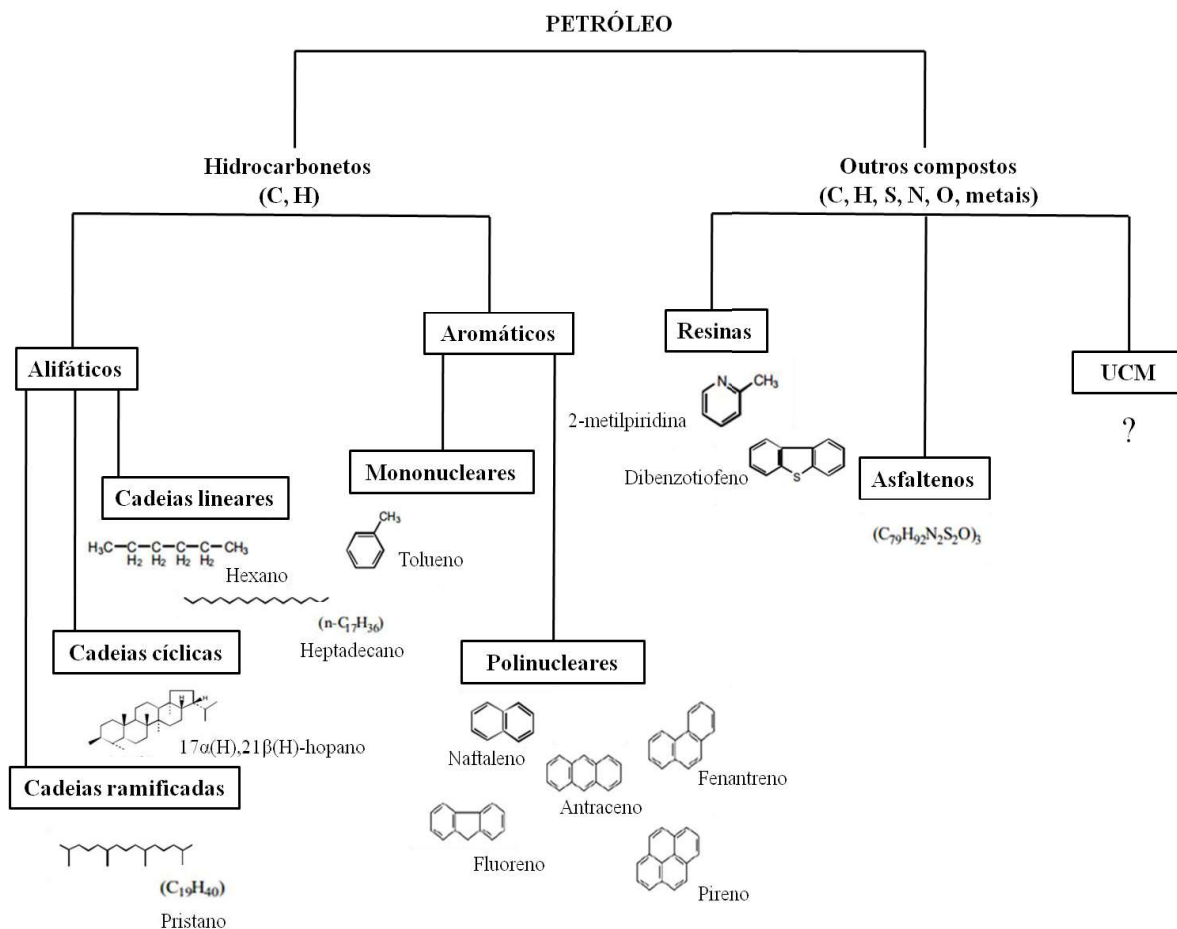
O Brasil, por sua vez, possui diversas reservas petrolíferas em seu território, recebendo destaque na área de exploração e produção de petróleo, ocupando a 10ª posição no ranking mundial entre os maiores produtores deste recurso (ANP, 2018).

## **1.2 Constituintes do petróleo**

O petróleo compreende uma ampla variedade de composições de óleos, consistindo em uma mistura de hidrocarbonetos e estruturas relacionadas. Os principais constituintes pertencem a quatro famílias: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos. Muitos estudos sobre a composição de petróleos de origens variadas baseiam esta classificação nas características de cada família majoritária (VANDECASTEELE; JONES, 2008a). Uma definição precisa da composição de um óleo em específico se torna praticamente impossível, considerando que não existem dois óleos exatamente idênticos (PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011; SPIGOLON et al., 2015). Além disso, com o passar do tempo, as características originais do petróleo podem sofrer modificações por processos geológicos e por ações antropológicas, as quais têm acelerado a formação de novos compostos.

Portanto, o petróleo é formado por milhares de compostos diferentes, sendo os hidrocarbonetos os principais componentes, 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 quantidades de metais também podem estar presentes (BORSATO, 2009). A Figura 1 ilustra as principais estruturas de hidrocarbonetos presentes na composição do petróleo.



**Figura 1. Composição e estrutura dos componentes mais representativos do petróleo bruto.**

Entre as principais classes de hidrocarbonetos presentes no petróleo e nos seus derivados, os hidrocarbonetos saturados são os componentes encontrados em maior concentração. Estes são também conhecidos como alifáticos ou *n*-alcanos, caracterizados por possuírem cadeias lineares que variam de 1 a 40 carbonos em sua estrutura. Nesta



classe, também fazem parte os hidrocarbonetos isoprenóides, os alcanos com estrutura ramificada, formados por unidades repetidas de isopreno (C<sub>5</sub>) sendo o pristano e o fitano os compostos mais representativos e comuns (KILLOPS; KILLOPS, 2005).

O grupo 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 pireno, os quais podem possuir dois ou mais anéis aromáticos (KILLOPS; KILLOPS, 2005; VOLLHARDT; SCHORE, 2004; ZHU et al., 2001). Muitos PAHs apresentam potencial mutagênico e carcinogênico, e outras propriedades tóxicas como bioacumulação e biomagnificação (BALACHANDRAN et al., 2012; KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004; VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

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 por exemplo piridinas e tiofenos. Especificamente na fração dos asfaltenos, alguns metais como níquel, vanádio e ferro também podem estar associados (KILLOPS; KILLOPS, 2005; ZHU et al., 2001).

Na composição do petróleo também existe à presença da chamada “mistura complexa não resolvida” (UCM, *Unresolved Complex Mixture*), a qual é constituída por componentes não identificados do petróleo (HEAD; JONES; RÖLING, 2006; MARCHAL et al., 2003).

### **1.3 Contaminação ambiental por hidrocarbonetos do petróleo e tecnologias de remediação**

O aumento contínuo na demanda por produtos a base de petróleo intensificou a exploração e a criação de pontos de extração deste composto, tanto em terra quanto em mar. Uma das principais etapas dos processos de extração dessa matriz energética consiste na perfuração de poços (CHEN et al., 2017). Durante essa fase, fluidos de perfuração são utilizados para estabilizar o poço, lubrificar e resfriar a broca, além de transportar o solo e os fragmentos de rochas à superfície do poço. Ao atingir a superfície, essa mistura, denominada de resíduo de perfuração, é submetida a processos de separação para que o fluido seja adequadamente recuperado e retorne ao poço (LEONARD; STEGEMANN, 2010). Porém, grande parte do fluido de perfuração permanece aderida ao resíduo durante os processos de separação, influenciando na sua composição química, que varia de acordo com o tipo de fluido utilizado e a composição da rocha perfurada. Estes resíduos remanescentes por sua vez, são heterogêneos, sólidos ou semi-sólidos e contêm hidrocarbonetos, sais solúveis em água e metais pesados (HU; LI; ZENG, 2013; JAFARINEJAD, 2017b).

Nesse contexto, diante ao aumento dos processos de extração, refino e processamento do petróleo grandes volumes de resíduos são gerados, todos os dias, ao redor do mundo pela indústria petroquímica (JAFARINEJAD, 2017c). Estes compostos são altamente nocivos para saúde humana e devido às características tóxico-carcinogênicas e sua disposição inadequada geram uma séria ameaça para o ambiente.

Desta forma, diversos métodos físicos, químicos e biológicos vêm sendo estudados para o tratamento deste tipo resíduo industrial (CHEN et al., 2017; FULLER et al., 2004; LEONARD; STEGEMANN, 2010; ZHU et al., 2001).

Além disso, outro grande problema são os acidentes ambientais envolvendo derramamentos de petróleo. Estes têm aumentado drasticamente, e entre suas principais causas estão os problemas de navegação que resultam em extensos vazamentos de petróleo e seus derivados no ambiente aquático (DAS; CHANDRAN, 2011a). Esses acidentes podem ser decorrentes de diversos fatores, como estado precário das embarcações e navios, descumprimento das normas de segurança, explosões e incêndios nas plataformas, falha humana, fenômenos ambientais, entre outros.

Um dos primeiros desastres ambientais, que chamou a atenção da sociedade para essas questões, ocorreu em 1989 no Alasca, quando o petroleiro Exxon Valdez derramou cerca de 41 milhões de litros de petróleo na costa marinha de Prince William Sound (ATLAS; HAZEN, 2011; BOUFADEL; GENG; SHORT, 2016; BRAGG et al., 1994). Como resultado, a mancha de contaminação se espalhou por aproximadamente 2.000 km nas margens do golfo do Alasca. A mortalidade de centenas de aves e mamíferos marinhos foi reportada, além de uma redução significativa na população de muitos organismos. Este acidente ocasionou grande impacto ambiental em longo prazo. As águas e areias de Prince William Sound permanecem contaminadas até os dias de hoje (ATLAS; HAZEN, 2011; BOUFADEL; GENG; SHORT, 2016; BRAGG et al., 1994; PRITCHARD, 1991; R. BRAGG et al., 1993).

Dois anos após, ocorreu o maior derramamento de óleo da história, porém desta vez não foi causado por um acidente. Durante a guerra do Golfo em 1991, quando as forças iraquianas se retiravam do Kuwait, as tropas abriram oleodutos e válvulas de poços de

petróleo e deliberaram fogo como uma medida para impedir que as forças dos Estados Unidos pousassem na área (MICHEL, 2011).

O incêndio iniciado após a abertura do primeiro poço em janeiro de 1991 durou até o fechamento do último poço no mês de abril daquele ano. Como resultado, cerca de 11 milhões de barris de petróleo foram lançados no Golfo Pérsico, matando centenas de peixes e mamíferos marinhos. O petróleo derramado foi transportado para o sul ao longo da costa, onde a maior parte do petróleo flutuante ficou presa atrás da ilha de Abu Ali e ao norte de Jubail, na Arábia Saudita. Durante os anos de 1992 e 1993, foram realizados estudos para conhecer o impacto de derramamentos de óleo na Arábia Saudita. Aproximadamente 1.163.000 barris de petróleo foram recuperados da superfície da água. A limpeza da linha costeira foi feita em algumas pequenas áreas (MICHEL, 2011).

Posteriormente, em abril de 2010, no Golfo do México, outra grande tragédia atraiu a atenção mundial. Esse foi o maior derramamento de óleo em águas americanas e ocorreu devido uma explosão ocorrida na plataforma BP Deepwater Horizon, onde aproximadamente 500 toneladas de óleo foram lançadas ao mar, causando um prejuízo de bilhões de dólares e um grande impacto ambiental em águas profundas. 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 da presença de óleo na superfície, entretanto, uma grande deposição de petróleo em sedimentos e na orla costeira continuou sendo observada (ATLAS; HAZEN, 2011; BOOPATHY; SHIELDS; NUNNA, 2012; DRILLING, [s.d.]; KOSTKA et al., 2011; SCOMA; YAKIMOV; BOON, 2016).

Como demonstrado, devido ao elevado impacto de acidentes ambientais causados por derramamentos de petróleo e seus derivados, se faz necessária a elaboração de soluções para remediar os ambientais marinhos e costeiros. A seleção da ação corretiva específica a

ser utilizada é um processo complexo e para que isso ocorra, é imprescindível o reconhecimento adequado das características do poluente e a reação do ambiente contaminado (MAIER; GENTRY, 2015). Ambientes distintos, respondem de formas distintas a um mesmo contaminante, assim como um mesmo ambiente pode reagir de formas diferentes a diferentes contaminantes.

Desta forma, uma grande variedade de tecnologias pode ser utilizada na remediação de ambientes impactados por petróleo. Na ocasião de incidentes com liberação de grandes quantidades de petróleo, primeiramente medidas de natureza física devem ser adotadas, como por exemplo, a remoção mecânica e a contenção do espalhamento do óleo. Em seguida, métodos químicos são rotineiramente utilizados, envolvendo técnicas como extração por solventes, oxidação, precipitação, neutralização, além do uso de substâncias químicas com características capazes de dispersar o contaminante, os chamados surfactantes químicos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; CAMILLI et al., 2010; FULLER et al., 2004).

Porém, devido ao alto custo associado e à incapacidade de remoção total dos contaminantes durante a utilização de técnicas físicas e químicas, os processos biológicos despontam entre os métodos mais promissores para o tratamento de uma variedade de contaminantes orgânicos. Essa metodologia, conhecida como biorremediação, é baseada na utilização de um conjunto de técnicas biotecnológicas, que surgem como uma alternativa de descontaminação de áreas impactadas, oferecendo a possibilidade de degradar contaminantes tóxicos, utilizando atividades biológicas de microrganismos com capacidades metabólicas e fisiológicas (VANDECASTEELE; JONES, 2008a). Além disso, a biorremediação é ambientalmente sustentável e pode ser realizada no local (*in situ*) onde os resíduos estão acumulados (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

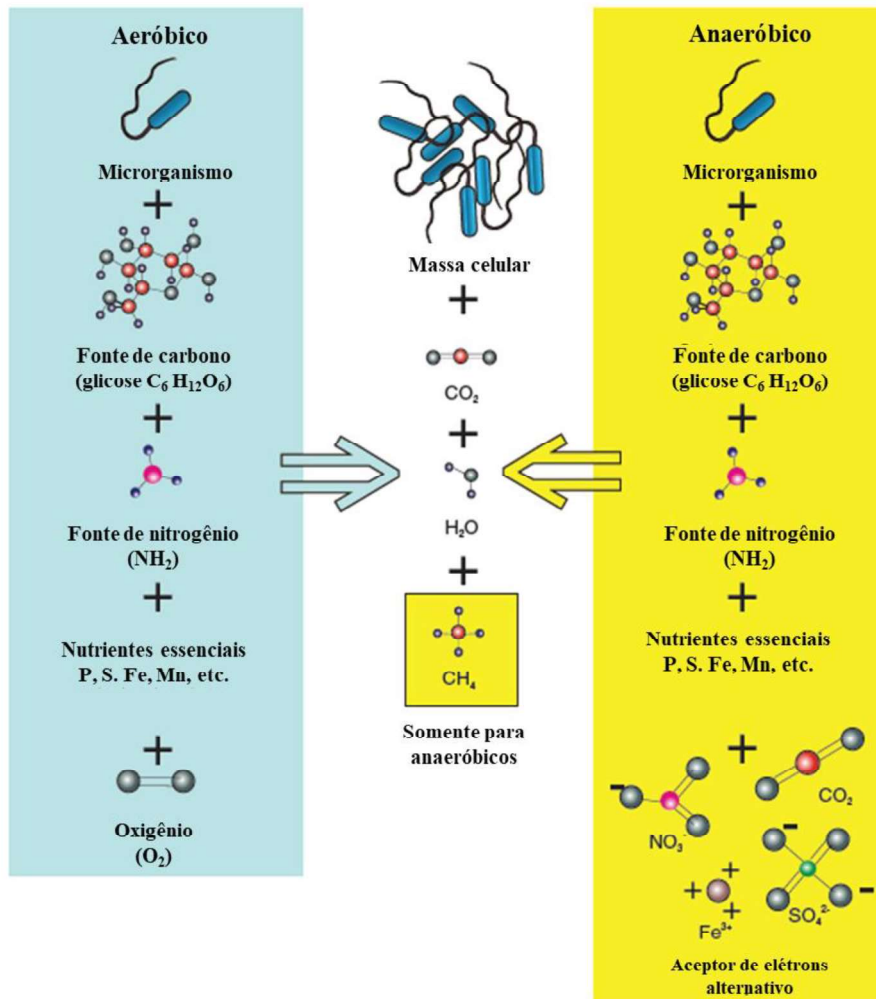
Entre as principais técnicas de biorremediação, três têm se destacado: (i) atenuação natural, processo onde ocorre o tratamento dos contaminantes *in situ*, com base em eventos naturais como a biodegradação, diluição, volatilização e absorção, ocasionando a descontaminação dos ambientes. Assim, a microbiota nativa é utilizada para realizar a biorremediação, e os fatores bióticos e abióticos do próprio sistema são responsáveis pela eficiência da biodegradação; (ii) bioestimulação, 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 (N) e fósforo (P) para se estabelecer relações adequadas de carbono: fósforo: nitrogênio para o desenvolvimento microbiano; (iii) bioaugmentação, baseada na introdução de microrganismos específicos com potencial, previamente estabelecido, para degradar o contaminante alvo (CERQUEIRA et al., 2012; MEYER, 2011; SARKAR et al., 2016; VANDECASTEELE; JONES, 2008a; WU et al., 2016).

#### **1.4 Biodegradação de compostos orgânicos**

Quando um contaminante orgânico entra em contato com o ambiente, diferentes tipos de degradação podem ocorrer. Dentre elas estão, a degradação abiótica como por exemplo, evaporação e/ou volatilização, foto-oxidação, bioacumulação e reações de oxidação química, e a degradação biótica, com a participação de populações microbianas com atividade de biodegradação.

A biodegradação consiste na quebra de contaminantes orgânicos através da atividade metabólica microbiana (MAIER; GENTRY, 2015). Desta forma, a

biodegradação completa ou mineralização envolve a oxidação do composto original na formação de dióxido de carbono e água. Este processo fornece carbono e energia para o desenvolvimento e reprodução de células. A Figura 2 ilustra a mineralização de um composto orgânico sob condições aeróbicas e anaeróbicas.



**Figura 2. Degradação aeróbica e anaeróbica de compostos orgânicos por microrganismos. Aeróbica (azul) e anaeróbica (amarelo).** Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).

As etapas de degradação que constituem a mineralização são semelhantes, sendo o substrato um açúcar simples, como glicose, um polímero vegetal como a celulose, ou uma molécula poluente, como os hidrocarbonetos. Cada passo da degradação é catalisado por

uma enzima específica produzida pela célula. Essas enzimas são mais frequentemente encontradas dentro das células, mas também podem ser secretadas para o ambiente extracelular, a fim de auxiliar as reações de degradação. Alguns contaminantes orgânicos são degradados parcialmente, porém não completamente. Isso pode ser resultado da ausência da enzima de degradação apropriada. Um segundo tipo de degradação incompleta é conhecido como cometabolismo, neste processo ocorre uma oxidação parcial do substrato, mas a energia derivada da oxidação não é usada para sustentar o crescimento microbiano. O cometabolismo pode ocorrer durante períodos de crescimento ativo da célula ou pode resultar da interação de células em repouso com um composto orgânico. A falta de enzimas biodegradáveis apropriadas é uma razão para a persistência de contaminantes orgânicos, particularmente aqueles com estruturas químicas incomuns existentes que as enzimas não reconhecem (VANDECASTEELE; JONES, 2008).

A atividade microbiana pode ser limitada por fatores biológicos e físico-químicos. Esses fatores incluem baixo número de microrganismos, oxigênio ou disponibilidade de nutrientes insuficiente, bem como temperatura e disponibilidade de água abaixo do ideal. A taxa de degradação de um composto orgânico também depende de fatores relacionados à estrutura e às propriedades físico-químicas (GIBSON, 1984; MAIER;. GENTRY, 2015; VANDECASTEELE; JONES, 2008).

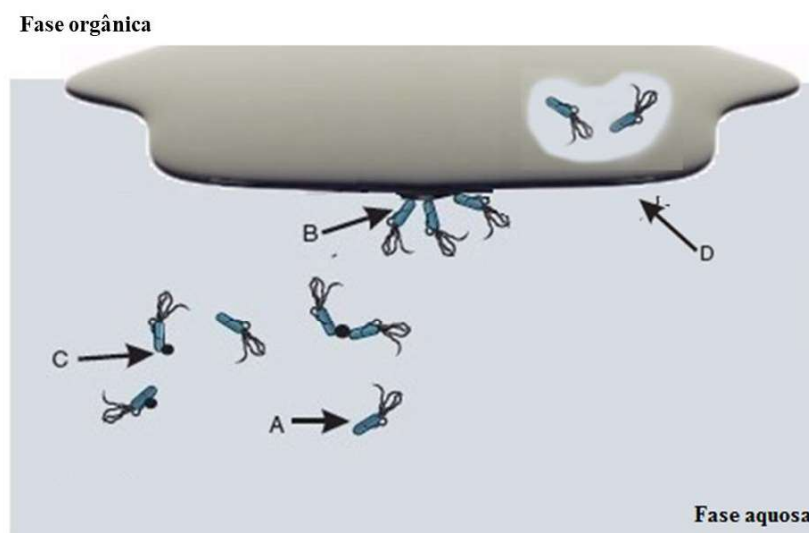
Acúmulo de resíduos e/ou derramamentos de produtos petroquímicos podem envolver concentrações extremamente altas de contaminantes. Nesses casos, a toxicidade do contaminante para populações microbianas pode atrasar o processo de remediação. Essa toxicidade é devida, principalmente, a um modo de ação que se baseia na partição de um contaminante dissolvido na camada lipofílica da membrana celular, o que provoca uma ruptura da integridade da membrana. Esse efeito é importante porque, devido a interações



hidrofóbicas, a membrana celular é um importante local de acúmulo de contaminantes orgânicos em microrganismos (MAIER; GENTRY, 2015).

Existem dois importantes passos no processo biodegradativo. O primeiro é baseado na absorção do substrato pela célula e o segundo no metabolismo ou degradação do substrato. Assumindo a presença de uma via metabólica apropriada, a degradação de um contaminante pode prosseguir rapidamente se o mesmo estiver disponível em uma forma solúvel em água. No entanto, a degradação desses contaminantes com limitada solubilidade em água ou que são fortemente adsorvidos no solo ou sedimentos pode ser limitada devido à sua baixa biodisponibilidade (CACHADA et al., 2014; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; MAIER; GENTRY, 2015).

Existem maneiras variadas pelas quais as células microbianas podem absorver hidrocarbonetos em meios aquosos. A Figura 3 mostra as possíveis formas de utilizar hidrocarbonetos quando o óleo é derramado em águas marinhas.



**Figura 3. Processos de captura de hidrocarbonetos pela célula microbiana.** (A) Utilização de compostos orgânicos solubilizados. (B) Adesão de células microbianas por contato direto com a fonte hidrofóbica. (C) Absorção por contato direto com hidrocarbonetos dispersos em microgotículas. (D) Absorção de hidrocarbonetos por produção de biossurfactantes. Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).

Conforme observado na Figura 3, os microrganismos podem absorver hidrocarbonetos de petróleo dissolvidos na fase aquosa. Esse modo de absorção torna-se limitante à medida que a solubilidade em ambiente aquoso do hidrocarboneto diminui (A). A absorção via contato direto de células degradadoras na interface hidrocarboneto e meio aquoso também pode ocorrer. Este modo de absorção é limitado pela área interfacial entre a fase de água e o hidrocarboneto (B). Outra maneira é absorção através do contato direto de células degradadoras com gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Este modo de absorção é limitado pela formação de tais gotículas. No ambiente marinho, a ação das ondas pode criar dispersão substancial do petróleo. Em um ambiente de solo, essa dispersão é mais limitada (C). E por fim, pode acontecer uma absorção aprimorada como resultado da produção de biossurfactantes ou emulsificantes que efetivamente aumentam a solubilidade aquosa aparente do hidrocarboneto ou permitem uma melhor fixação das células ao hidrocarboneto (D) (MAIER e GENTRY, 2015).

Neste contexto, para compensar a baixa disponibilidade dos hidrocarbonetos os microrganismos empregam mecanismos fisiológicos para aumentar a transferência de massa do contaminante para a célula. Esses mecanismos são baseados principalmente na produção de agentes tensoativos (biossurfactantes) e na capacidade de adesão aos substratos sólidos mediante a formação de biofilmes (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; MULLIGAN; MUDHOO; SHARMA, 2014; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Diversos estudos relatam a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos, os quais podem ser produzidos de forma constitutiva ou induzida, a partir de múltiplos substratos, incluindo açúcares, óleos e resíduos (CHRZANOWSKI; ŁAWNICZAK; CZACZYK, 2012; MORO et al., 2018; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Biossurfactantes são moléculas constituídas por um domínio hidrofílico e outro hidrofóbico que desempenham habilidades de emulsificação e ainda reduzem a tensão superficial entre dois líquidos de diferentes polaridades (BANAT et al., 2010; FRANZETTI; TAMBURINI; BANAT, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

Esses compostos podem ser divididos em duas principais categorias, aqueles de baixo peso molecular, como glicolípideos, lipopeptídeos e proteínas, e os de alto peso molecular (bioemulsificantes) como proteínas lipopolissacarídicas ou lipoproteínas (VANDECASTEELE; JONES, 2008a; WARD et al., 2009). Os principais surfactantes produzidos por diferentes microrganismos estão listados na Tabela 1.

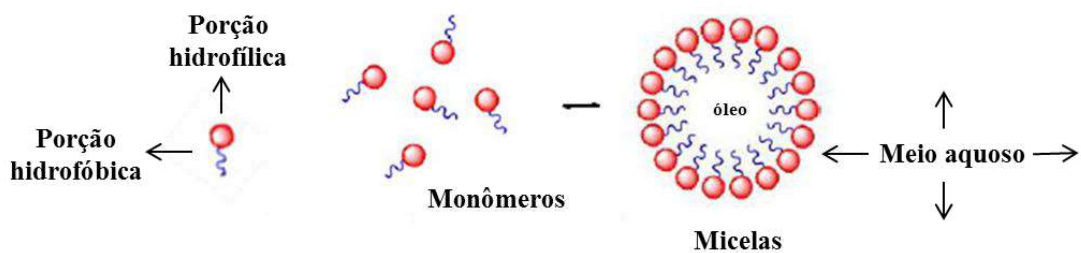
**Tabela 1. Principais surfactantes produzidos por microrganismos.**

<b>Surfactante de baixo peso molecular</b>	<b>Microrganismo produtor</b>
Ramnolípideos <sup>a</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealolípideos <sup>a</sup>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Oligossacarídeo lipídeos <sup>a</sup>	<i>Nocardia corynebacteroides</i>
Soforolípideos <sup>a</sup>	<i>Torulopsis bombicola</i>
Gramidicina S <sup>b</sup>	<i>Bacillus brevis</i>
Surfactinas <sup>b</sup>	<i>Bacillus subtilis</i>
Polimixinas <sup>b</sup>	<i>Bacillus polymyxa</i>
Iturinas <sup>b</sup>	<i>Bacillus sp.</i>
<b>Surfactante de alto peso molecular</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter cacoeticus</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter cacoeticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Emulsan 378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

<sup>a</sup> Glicolípideos. <sup>b</sup> Lipopeptídeos.

Fonte: adaptado de Vandecasteele e Jones (2008).

Existem dois efeitos bem conhecidos dos biossurfactantes. Primeiro, eles podem efetivamente aumentar a solubilidade aquosa do hidrocarboneto através da formação de micelas ou vesículas que se associam com hidrocarbonetos como demonstrado na Figura 4.



**Figura 4. Formação de micelas por moléculas tensoativas quando em contato com compostos hidrofóbicos em meio aquoso.**

Desta forma, essas moléculas podem se reunir para formar micelas esféricas em um esforço para separar suas regiões apolares do contato com a fase aquosa. A dimensão das micelas produzidas pode variar de acordo com a natureza do tensoativo. Uma das formas mais eficientes de avaliar a eficiência de um biossurfactante é pela determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC), definida como a concentração mínima necessária para iniciar o processo de formação de micelas (MORO et al., 2018; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; MULLIGAN; MUDHOO; SHARMA, 2014).

Outro efeito conhecido da ação dos biossurfactantes é a capacidade de facilitar a ligação das células ao hidrocarboneto, tornando a superfície celular mais hidrofóbica e, assim, mais apta a aderir a uma fase oleosa separada. Assim, a produção de biossurfactantes torna possível alcançar taxas de biodegradação muito melhoradas na presença de biossurfactantes (BEZZA; CHIRWA, 2017; CAMEOTRA; SINGH, 2008a; MESBAIAH et al., 2016; NOPARAT; MANEERAT; SAIMMAI, 2014; RAHMAN; GAKPE, 2008).

Por fim, microrganismos também podem produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*). Tem sido demonstrado que alguns poluentes clorados podem ser acumulados em biofilmes por adsorção a exopolímeros microbianos e então serem metabolizados em períodos de escassez de fontes

de carbono. Em relação aos hidrocarbonetos, adsorção ao EPS foi descrita e alguns autores sugerem que o EPS possa estar envolvido no armazenamento desses contaminantes em biofilmes (JOHNSEN; WICK; HARMS, 2005).

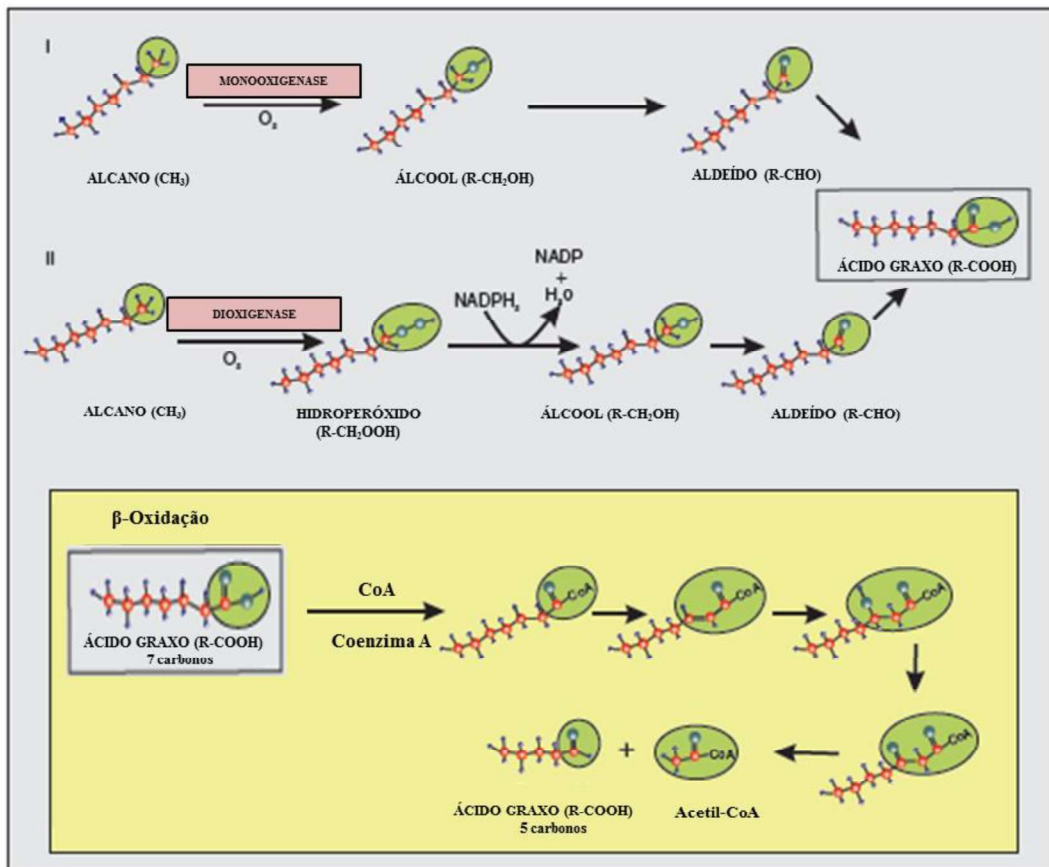
#### 1.4.1 Mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos

Existem várias fontes de hidrocarbonetos alifáticos comumente encontrados no ambiente como contaminantes. Estes incluem estruturas de cadeia linear e ramificada encontradas nos hidrocarbonetos de petróleo (DAS; CHANDRAN, 2011b; FERREIRA et al., 2012; SPEIGHT, 2014). Na Tabela 2 podemos observar as propriedades físico-químicas e as estruturas de diferentes hidrocarbonetos alifáticos.

**Tabela 2. Principais propriedades físico-químicas de Hidrocarbonetos alifáticos.**

<b>Hidrocarboneto</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Solubilidade em água(mg/L)</b>
Metano	CH <sub>4</sub>	16,04	35
Propano	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	44,1	75
Hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,18	95
Nonano	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	128,2	0,00071
Undecano	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156,3	0,00035
Tridecano	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184,4	0,000096
Pentadecano	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212,4	0,00000076
Heptadecano	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240,5	0,000014
Pristano	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	268,5	0,000017
Fitano	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282,5	0,000017
Tricosano	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	324,6	0,000005
Hexacosano	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	366,7	0,0000041
Nonacosano	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	408,6	0,0000044
Dotriacontano	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	450,9	0,0000042
Tetatriacontano	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>	493,94	0,0000048

Devido à semelhança estrutural dos alcanos com ácidos graxos, que se encontram onipresentes na natureza, muitos microrganismos no ambiente podem utilizar *n*-alcanos como única fonte de carbono e energia (MAIER; GENTRY, 2015; ROJO, 2009). Como resultado, os alcanos são geralmente considerados o tipo de hidrocarboneto mais facilmente biodegradável. A biodegradação de alcanos, que ocorre com uma alta demanda biológica de oxigênio, utiliza uma das duas principais vias, que estão ilustradas na Figura 5.



**Figura 5. Degradação aeróbica de hidrocarbonetos alifáticos por microrganismos.**  
Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).

A via mais comum é a incorporação direta de um átomo de oxigênio em um dos carbonos das extremidades do alcano por uma enzima monooxigenase, seguida por uma

desidrogenação (I). Alternativamente, uma enzima dioxigenase pode incorporar dois átomos de oxigênio no hidrocarboneto para formar um hidroperóxido (II). O resultado final de ambas as vias é a produção de um ácido graxo primário (Figura 5). Existem também exemplos na literatura de oxidação diterminal, com ambas as extremidades do alcano oxidado, e de oxidação subterminal, com um carbono no interior da cadeia oxidado (ATLAS, 1981; FUNHOFF; VAN BEILEN, 2007; GIBSON, 1984; ROJO, 2009; VAN BEILEN; FUNHOFF, 2007; VASCONCELOS, 2006).

O resultado 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 (FUENTES et al., 2014; MAIER; GENTRY, 2015; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Os ácidos graxos são metabólitos comuns encontrados em todas as células. Eles são usados na síntese de fosfolipídios de membrana e materiais de armazenamento de lipídios (MAIER; GENTRY, 2015). A via comum utilizada para metabolizar ácidos graxos é conhecida como  $\beta$ -oxidação, esta via cliva fragmentos consecutivos de dois carbonos (Figura 5). Cada fragmento de dois carbonos é removido pela coenzima A, e então entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para mineralização completa, resultando em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Se este processo iniciar com um alcano que tem um número par de carbonos, o fragmento de dois carbonos acetil-CoA será o último resíduo. Se começar com um alcano com número ímpar de carbonos, o fragmento de três carbonos propionil-CoA será o último resíduo. O propionil-CoA é então convertido em succinil-CoA, uma molécula de quatro carbonos que é um intermediário do ciclo de TCA (GIBSON, 1984; MAIER; GENTRY, 2015; MÜLLER, 2009).

Desta forma, existem duas classes de monooxigenases conhecidas para degradação de hidrocarbonetos alifáticos, as quais são denominadas de alceno hidroxilases. A diferença entre elas consiste na presença de um único aminoácido que determina a faixa de substrato para cada enzima. As alceno hidroxilases do tipo 1 (AH1) oxidam alcanos de cadeias carbônicas médias e curtas (VANDECASTEELE; JONES, 2008a). Já a outra classe, as alceno hidroxilases do tipo 2 (AH2), oxidam cadeias longas de alcanos (>40 carbonos), as quais pertencem a maioria dos membros da família de enzimas AlkB.

O sistema das alceno hidroxilases AlkB consiste na ação de três proteínas: hidroxilase, rubredoxina e rubredoxina reductase. Estas duas últimas proteínas atuam como carreadoras de elétrons entre NADH e a hidroxilase. As hidroxilases são proteínas de alta massa molecular encontradas na membrana citoplasmática, na qual a atividade depende da presença de fosfolípidos e ferro. Desta forma, a rubredoxina (AlkG) é uma proteína que contém um ou mais centros ativos com átomos de ferro e a rubredoxina reductase (AlkT) é uma flavoproteína. Os genes desse complexo geralmente são agrupados dentro de *operons* ou em plasmídeos (AMOURIC et al., 2010; FUNHOFF; VAN BEILEN, 2007; VAN BEILEN; FUNHOFF, 2005; WARD et al., 2009). Para que a oxidação do hidrocarboneto alifático ocorra completamente, também é necessária a presença de enzimas álcool desidrogenases, aldeído desidrogenases, acil-CoA sintetases e uma proteína de membrana, a qual realiza o transporte dos substratos.

Além da classe AlkB, outros sistemas de alceno hidroxilases, envolvidos na oxidação inicial de alcanos maiores que *n*-C<sub>5</sub>, foram descritos, tais como os sistemas Citocromo P450 (CYP153) que oxidam alcanos C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> (VAN BEILEN; FUNHOFF, 2005) ou a alceno dioxigenase contendo flavina com uma gama de substratos entre C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub> (MAIER; GENTRY, 2015). De fato, para muitos degradadores de *n*-alcanos, uma



combinação de diferentes sistemas de oxidação de alcanos com faixas sobrepostas de substratos foi relatada (AMOURIC et al., 2010).

#### 1.4.2 Mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Dentre os compostos orgânicos presentes no petróleo, os de maior preocupação são os PAHs, os quais contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do petróleo (BALACHANDRAN et al., 2012; KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004; VOLLHARDT; SCHORE, 2004). A Tabela 3 lista os 16 PAHs caracterizados como poluentes prioritários.

**Tabela 3. Principais propriedades físico-químicas de PAHs.**

	PAH	Nº de anéis	Peso molecular	Solubilidade em água(mg/L)
1	Naftaleno	2	128	31
2	Acenaftileno	3	152	16
3	Acenafteno	3	154	3,8
4	Fluoreno	3	166	1,9
5	Fenantreno	3	178	1,1
6	Antraceno	3	178	0,045
7	Fluoranteno	4	202	0,26
8	Pireno	4	202	0,13
9	Benzo[a]antraceno	4	228	0,011
10	Criseno	4	228	0,006
11	Benzo[b]fluoranteno	5	252	0,0015
12	Benzo[k]fluoranteno	5	252	0,0008
13	Benzo[a]pireno	5	252	0,0038
14	Dibenzo[a,h]antraceno	6	278	0,0006
15	Indeno[1,2,3-cd]pireno	6	276	0,00019
16	Benzo[ghi]perileno	6	276	0,00026

Fonte: United States Environmental Protection Agency (USEPA).

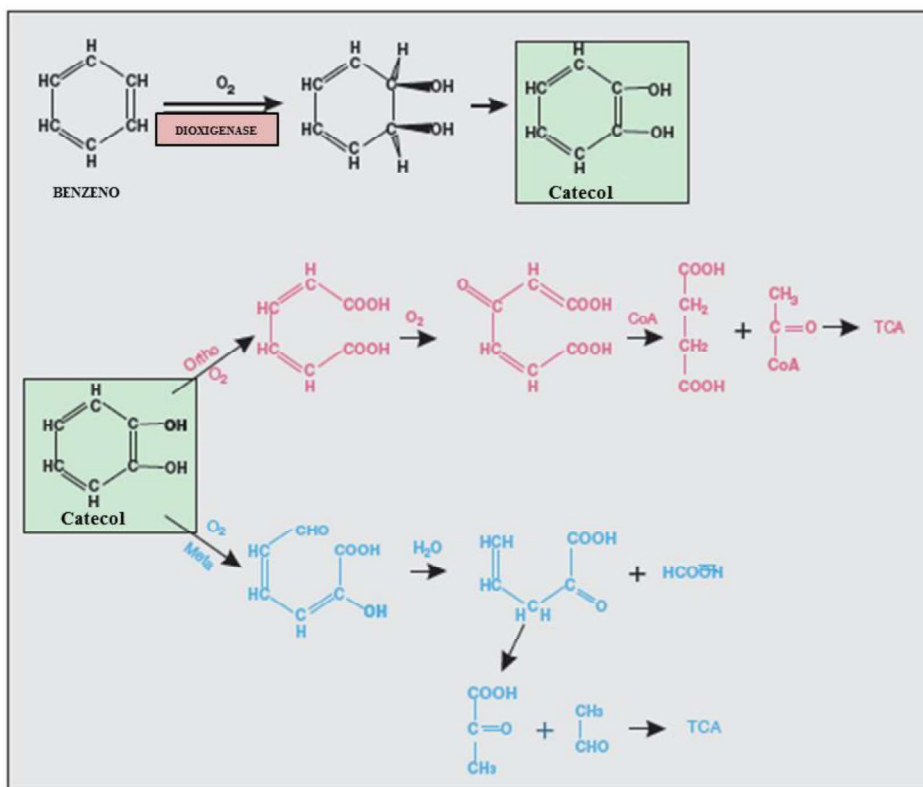
Compostos aromáticos contêm pelo menos um sistema de anel insaturado com a estrutura geral  $C_6R_6$ , onde R é qualquer grupo funcional. O benzeno ( $C_6H_6$ ) é o hidrocarboneto original desta família. Compostos contendo dois ou mais anéis benzênicos fundidos são chamados de PAHs (CHAUDHARY et al., 2015; MAIER; GENTRY, 2015; MÜLLER, 2009; ORTEGA-GONZÁLEZ et al., 2013).

Uma ampla variedade de bactérias e fungos pode realizar transformações aromáticas, tanto parciais quanto completas, sob uma variedade de condições ambientais (ARULAZHAGAN; VASUDEVAN, 2011; CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2010; FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; GRIFOLL et al., 1995; LADINO-ORJUELA et al., 2016; M BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Classicamente, os hidrocarbonetos aromáticos podem ser metabolizados por microrganismos mediante três mecanismos: (i) a oxidação do anel aromático por dioxigenases; (ii) a oxidação do anel aromático por monooxigenases do citocromo P-450; e (iii) a oxidação do anel aromático por peroxidases (Figura 6) (MAIER; GENTRY, 2015; VANDECASTEELE; JONES, 2008).

Em condições aeróbicas, a transformação inicial mais comum é uma hidroxilação que envolve a incorporação de oxigênio molecular. As enzimas envolvidas nessas transformações iniciais são monooxigenases ou dioxigenases. Em geral, as dioxigenases atuam na formação de duas hidroxilas e transformam os compostos aromáticos a *cis*-dihidrodiol. O *cis*-dihidrodiol é rearomatizado para formar um intermediário, conhecido como catecol. O anel de catecol é clivado por uma segunda dioxigenase entre os dois grupos hidroxila (via *orto*), pela ação das intradiol dioxigenases, ou entre o átomo de carbono e o grupo hidroxila (via *meta*), pela ação das extradiol dioxigenases. Após a clivagem dos compostos aromáticos, estes são transformados em intermediários de rotas

metabólicas do TCA (MAIER; GENTRY, 2015; ROJO, 2009; VANDE CASTEELE; JONES, 2008; WARD et al., 2009). A Figura 6 ilustra o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos pelos dois grupos de dioxigenases citados.

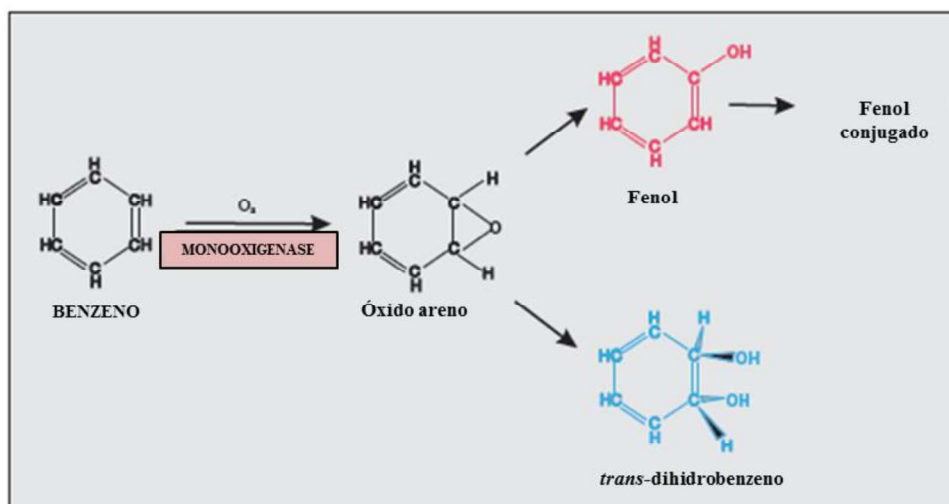


**Figura 6. Principais etapas de degradação de hidrocarbonetos aromáticos sob condições aeróbicas.** Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).

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, 1992). Já as enzimas de fissão são responsáveis por reconhecer estes intermediários e clivar seu anel aromático.

A maioria dos microrganismos eucarióticos não mineraliza os aromáticos, ao contrário, eles são processados para desintoxicação e excreção. Isso é feito por uma

oxidação inicial com uma monooxigenase do citocromo P-450 que incorpora um átomo de oxigênio molecular no aromático, resultando na formação de um óxido de areno. Isto é seguido pela adição enzimática de água para produzir um *trans*-dihidrodiol (Figura 7). Alternativamente, o óxido de areno pode ser isomerizado para formar fenóis, que podem ser conjugados com sulfato, ácido glucurônico e glutathione. Estes conjugados são semelhantes àqueles formados em organismos superiores que são usados na eliminação de compostos aromáticos (MAIER; GENTRY, 2015; ROJO, 2009; VANDECASTEELE; JONES, 2008).



**Figura 7. Degradação fúngica de compostos aromáticos pela ação de monooxigenases.** Fonte: adaptado de MAIER e GENTRY (2015).

Um pequeno grupo de eucariotos, os fungos lignolíticos podem mineralizar completamente compostos aromáticos em um processo conhecido como degradação lignolítica. A fim de degradar uma estrutura baseada em aromáticos amorfos, como a lignina, os fungos liberam enzimas extracelulares não específicas, como a lacase ou a peroxidase de lignina dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essas enzimas geram radicais livres à base de oxigênio que reagem com o polímero de lignina para liberar resíduos que são absorvidos

pela célula e degradados. Como a estrutura da lignina é baseada em uma estrutura aromática e as enzimas iniciais usadas para degradar a lignina são inespecíficas, os fungos são capazes de usar a mesma atividade para degradar uma variedade de contaminantes aromáticos (MAIER; GENTRY, 2015; ROJO, 2009; VANDECASTEELE; JONES, 2008).

### **1.5 Aplicação de consórcios microbianos na remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos**

Uma ampla variedade de estudos tem descrito microrganismos com capacidade de utilizar compostos petroquímicos como única fonte de carbono e energia (CERQUEIRA et al., 2011a; DAS; CHANDRAN, 2011b; DAS; KAZY, 2014; SARKAR et al., 2017; VILA; GRIFOLL, 2009). Desta forma, caracterizar linhagens degradadores de hidrocarbonetos de petróleo tem se demonstrado extremamente útil para o melhoramento de estratégias de remediação desses compostos.

Diferentes microrganismos fornecem graus distintos de degradação de hidrocarbonetos. Associações de microrganismos aumentam sua capacidade de utilizar um grande número de hidrocarbonetos como única fonte de carbono para a sobrevivência. Esses microrganismos podem mineralizar completamente os compostos de petróleo através das ações metabólicas de uma ou mais linhagens ( GUERRA et al., 2018; JACQUES et al., 2005; KADALI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017; NAPP et al., 2018b). Além disso, mesmo que muitos microrganismos não sobrevivam em ambientes apenas com hidrocarbonetos de petróleo e assim não metabolizem esses compostos, eles podem contribuir para a comunidade global de microorganismos por expressão de suas vias metabólicas únicas. A literatura descreve extensivamente que as bactérias

hidrocarbonoclasticas não são as únicas capazes de degradar hidrocarbonetos e/ou produzir biosurfactantes (CHRONOPOULOU et al., 2015; SCHNEIKER et al., 2006).

Desta forma, a aplicação de culturas mistas nos ambientes contaminados com petróleo apresenta características mais vantajosas que as culturas puras, devido ao efeito de interações sinérgicas e cometabólicas entre os membros da associação. A degradação completa de hidrocarbonetos envolve o uso de consórcios microbianos, incluindo procariotos e eucariotos (GUERRA et al., 2018; HEAD; JONES; RÖLING, 2006; KOSTKA et al., 2011; OWSIANIAK et al., 2009; RIZZO et al., 2006; TREMBLAY et al., 2017).

## **1.6 Ferramentas moleculares empregadas na microbiologia do petróleo**

O conhecimento da diversidade taxonômica e metabólica é essencial para entender o papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem nos ecossistemas. Grande parte dos microrganismos encontrados na natureza não são cultiváveis e tampouco isolados pelos métodos tradicionais. Desta forma, estima-se que 99% da diversidade microbiana permanece desconhecida (HANDELSMAN, 2004; OLIVEIRA et al., 2015). Especialmente, devido ao fato de as condições nutricionais necessárias para o desenvolvimento celular não serem obtidas artificialmente. Além disso, em amostras ambientais muitos microrganismos não estão presentes em proporções abundantes e acabam sendo desconsiderados durante os métodos de cultivos clássicos (HANDELSMAN, 2004; HANDELSMAN et al., 1998; KUNIN et al., 2008). Desta forma, os métodos moleculares e a engenharia de proteínas têm renovado consideravelmente as pesquisas científicas no ramo da microbiologia e assim, ampliado suas aplicações.

Neste contexto, estudos metagenômicos têm emergido como uma estratégia para analisar as comunidades microbianas de diversos ambientes, tornando possível o acesso ao potencial genético de microrganismos sem a necessidade de utilizar meios de isolamento em laboratório (MIRETE; MORGANTE; GONZÁLEZ-PASTOR, 2016).

Essa ferramenta molecular pode fornecer importantes informações, como (i) a identificação de padrões taxonômicos, (ii) a caracterização de vias metabólicas até então desconhecidas, (iii) o aumento da complexidade das vias biogeoquímicas (iv) a análise da interação entre os membros das comunidades microbianas, e (v), a identificação de novas enzimas e moléculas com diversas aplicações (KUNIN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015).

A metagenômica consiste na extração e sequenciamento de DNA a partir de diversas amostras. Esse material genético fica então disponível para realização de várias análises, como por exemplo, o sequenciamento de DNA em larga escala (HANDELSMAN, 2004; MIRETE; MORGANTE; GONZÁLEZ-PASTOR, 2016; OULAS et al., 2015).

Na última década, a metagenômica baseada no sequenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) gerou um enorme volume de dados e se transformou em uma área de pesquisa em constante crescimento, principalmente devido a sua alta capacidade de análise, acessibilidade e baixo custo (DE FILIPPO et al., 2012; KUNIN et al., 2008; LADOUKAKIS; KOLISIS; CHATZIIOANNOU, 2014; MEYER et al., 2008). Essa evolução resultou em uma geração massiva de dados, e para analisar e processar essas sequências a bioinformática vem se aprimorando e acompanhando este progresso (DUDHAGARA et al., 2015; KUNIN et al., 2008).

As abordagens metagenômicas são geralmente realizadas de duas formas: metagenômica com análise baseada em uma sequência específica ou em sequências

inespecíficas (*shotgun*). Na primeira, a diversidade de um único gene é avaliada, essas análises são frequentemente empregadas para investigar a diversidade filogenética e abundância relativa de um determinado gene em uma amostra. Para isso, é necessário o desenho de iniciadores (*primers*) provenientes de regiões conservadas de genes ou famílias de proteínas já conhecidas. Esta abordagem é regularmente utilizada para investigar a diversidade taxonômica a partir de sequências de subunidades RNA ribossomal (16S/18S rRNA) em uma amostra. Na abordagem metagenômica baseada em sequências inespecíficas, o DNA total das amostras é extraído e fragmentado (*shotgun*), e bibliotecas metagenômicas são preparadas para determinar o conteúdo genético total da amostra. Essa é uma técnica poderosa para avaliar o potencial funcional de uma comunidade microbiana e para identificar classes completamente novas de genes que codificam funções novas ou conhecidas (AN et al., 2013; HANDELSMAN, 2004; KUNIN et al., 2008; TECHTMANN; HAZEN, 2016).

A utilização de servidores e programas, como por exemplo, o *Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology* (MG-RAST) e *MEtaGenome ANalyser* (MEGAN) tem auxiliado no processamento dos dados gerados. Esses avaliam automaticamente as atribuições filogenéticas e funcionais das sequências que pertencem à biblioteca metagenômica, bem como fornecem ferramentas para comparar diferentes metagenomas (DUDHAGARA et al., 2015; HUSON et al., 2007; MEYER et al., 2008).

Alguns bancos de dados permitem a realização de análises específicas, como por exemplo, o BioSurfDB (*Biosurfactant and Biodegradation Data Base*), o qual reúne informações sobre a caracterização de compostos e mecanismos biológicos envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos e produção de biosurfactantes (OLIVEIRA et al., 2015).



Neste contexto, grande parte da pesquisa sobre a biorremediação está focada na compreensão das taxas de degradação de contaminantes sob condições naturais ou alteradas. Embora os microrganismos sejam reconhecidos como essenciais para a biorremediação, muito pouco se sabe sobre as interações entre os microrganismos envolvidos ou as mudanças na comunidade das várias estratégias de intervenção microbiana. Desta forma, estudos metagenômicos também podem ser aplicados como uma ferramenta para investigar o impacto de contaminantes na alteração da estrutura de uma comunidade microbiana (TECHTMANN; HAZEN, 2016).

Assim, abordagens utilizando sequenciamento total de DNA também auxiliam a caracterizar novos genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos e na produção de surfactantes, que têm potencial para desenvolver uma estratégia de biorremediação é, portanto, promissora e representa um assunto importante de pesquisa.

Estes estudos podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas e criação de novos processos industriais e biotecnológicos, importantes para a preservação e planejamento ambiental.

## **2 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de degradação de consórcios e isolados microbianos, além de analisar os genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- I. Prospectar consórcios microbianos autóctones com atividade de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos;
- II. Analisar as vias metabólicas empregadas pelos consórcios microbianos selecionados pela identificação de genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes;
- III. Avaliar o potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo em água marinha pelos consórcios microbianos selecionados;
- IV. Isolar e caracterizar microrganismos que apresentem capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos;

### 3 RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão distribuídos em dois capítulos. O primeiro capítulo (item 3.1) aborda a análise taxonômica e funcional comparativa de consórcios microbianos expostos a hidrocarbonetos de petróleo. Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na forma de um artigo científico no periódico *Chemosphere* (Napp, *et al.*, 2018). Já os resultados apresentados no segundo capítulo (item 3.2), referem-se à avaliação da capacidade degradativa de microrganismos isolados selecionados a partir de amostras contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo e seu potencial para aplicação biotecnológica para a remediação de ambientes contaminados.

### **3.1 Capítulo I: Comparative Metagenomics Reveals Different Hydrocarbon Degradative Abilities from Enriched Oil-Drilling Waste**

Este capítulo apresenta o artigo publicado na revista Chemosphere em 11 de junho de 2018 (Napp, et al., 2018). Este trabalho contou com a colaboração de diferentes Laboratórios de Pesquisa.

No Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foi realizado o delineamento deste trabalho e as análises de produção de biossurfactantes, com a participação do aluno de doutorado José Evandro S. Pereira, sob a supervisão da Professora Marilene Henning Vainstein.

No Departamento de Biologia Celular e Genética do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, foram realizados os enriquecimentos microbianos e as análises taxonômicas e funcionais dos metagenomas, com o auxílio dos alunos de pós-doutorado Jorge S. Oliveira e Rita C. B. Silva-Portela sob a supervisão da Professora Lucymara F. Agnez-Lima.

No Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram realizadas as etapas de extração e fracionamento dos hidrocarbonetos, com o auxílio do aluno de doutorado José Evandro S. Pereira sob a supervisão da Professora Maria C. R. Peralba.

No Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram realizadas análises de quantificação de hidrocarbonetos, com o auxílio do aluno de doutorado José Evandro S. Pereira sob a supervisão da Professora Luciane M. P. Passaglia.

Além disso, este trabalho contou com o auxílio das Professoras Fátima M. Bento e Cláudia E. Thompson, as quais foram essenciais para a análise de dados e revisão do manuscrito.



## Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste

Amanda P. Napp<sup>a</sup>, José Evandro S. Pereira<sup>a</sup>, Jorge S. Oliveira<sup>b,c</sup>, Rita C.B. Silva-Portela<sup>c</sup>, Lucymara F. Agnez-Lima<sup>c</sup>, Maria C.R. Peralba<sup>d</sup>, Fátima M. Bento<sup>e</sup>, Luciane M.P. Passaglia<sup>f</sup>, Claudia E. Thompson<sup>a,g</sup>, Marilene H. Vainstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-070, Brazil

<sup>b</sup> INESC-ID/IST-Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores/Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa 1000-029, Portugal

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59072-970, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91500-970, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91500-970, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

### HIGHLIGHTS

- The study reports comparative metagenomics of distinct oil drilling waste-enriched samples.
- It comparatively evaluates the phylogenetic and functional diversity of two different oil drilling waste-enriched consortia.
- The sequences and metabolic pathways involved in oil degradation have been reported.
- The degradation treatments were satisfactory for a broad range of petroleum hydrocarbons.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 October 2017

Received in revised form

24 May 2018

Accepted 10 June 2018

Available online 11 June 2018

Handling Editor: Chang-Ping Yu

#### Keywords:

Oil drilling waste

Comparative metagenomics

Xenobiotics pathways

Hydrocarbon degradation

Microbial diversity

### ABSTRACT

The oil drilling process generates large volumes of waste with inadequate treatments. Here, oil drilling waste (ODW) microbial communities demonstrate different hydrocarbon degradative abilities when exposed to distinct nutrient enrichments as revealed by comparative metagenomics. The ODW was enriched in Luria Broth (LBE) and Potato Dextrose (PDE) media to examine the structure and functional variations of microbial consortia. Two metagenomes were sequenced on Ion Torrent platform and analyzed using MG-RAST. The STAMP software was used to analyze statistically significant differences amongst different attributes of metagenomes. The microbial diversity presented in the different enrichments was distinct and heterogeneous. The metabolic pathways and enzymes were mainly related to the aerobic hydrocarbons degradation. Moreover, our results showed efficient biodegradation after 15 days of treatment for aliphatic hydrocarbons (C8–C33) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), with a total of about 50.5% and 46.4% for LBE and 44.6% and 37.9% for PDE, respectively. The results obtained suggest the idea that the enzymatic apparatus have the potential to degrade petroleum compounds.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

With the aid of technology, the petrochemical industry plays a significant role in the global socioeconomic environment. They work hand in hand, contributing towards the economic and social development of countries worldwide (Cerqueira et al., 2011; Jafarimejad, 2017). The continuous increase in demand for petroleum-based products calls for the creation of more extraction

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [amanda.apn@gmail.com](mailto:amanda.apn@gmail.com) (A.P. Napp), [jespjbp@ig.com.br](mailto:jespjbp@ig.com.br) (J.E.S. Pereira), [oliveira.jorge.88@gmail.com](mailto:oliveira.jorge.88@gmail.com) (J.S. Oliveira), [silvaporkela.rcb@gmail.com](mailto:silvaporkela.rcb@gmail.com) (R.C.B. Silva-Portela), [lfagnez@ufrnet.br](mailto:lfagnez@ufrnet.br) (L.F. Agnez-Lima), [mcarmo@iq.ufrgs.br](mailto:mcarmo@iq.ufrgs.br) (M.C.R. Peralba), [fatima.bento@ufrgs.br](mailto:fatima.bento@ufrgs.br) (F.M. Bento), [luciane.passaglia@ufrgs.br](mailto:luciane.passaglia@ufrgs.br) (L.M.P. Passaglia), [thompson.ufcspa@gmail.com](mailto:thompson.ufcspa@gmail.com) (C.E. Thompson), [mhv@cbiot.ufrgs.br](mailto:mhv@cbiot.ufrgs.br) (M.H. Vainstein).

sites every year, both on land (onshore) and at sea (offshore).

The process of drilling oil and gas wells generates large volumes of petrochemical mud waste all over the world (Jafarinejad, 2017). This petrochemical mud is composed of harmful compounds, and its improper disposal creates a serious environmental threat. Accidents involving oil spills have drastically risen due to the increased amount of oil exploration and production nowadays, creating a major challenge concerning the treatment of contaminated areas (Das and Chandran, 2011).

Generally, drilling waste generated by the petrochemical industry is heterogeneous, soil-like waste, and contains a significant percentage of hydrocarbon-heavy metals and salts (Hu et al., 2013). Petroleum hydrocarbons in crude oil are composed of a complex mixture of aliphatics, alicyclics and PAHs. These hydrocarbons can vary in compositional and physical properties according to the reservoir's origin (Peixoto et al., 2011).

Petroleum reservoirs establish geological environments of deep subsurface sediment, which become microbial habitats capable of hosting a variety of different organisms (Sierra-García et al., 2014). Understanding these microbial communities and their metabolic activities regarding petrochemical waste is crucial for the future development of biotechnological applications in favor of achieving the degradation of the relentless accumulation of oil hydrocarbons in nature.

Bioremediation is a natural process where autochthonous and/or indigenous microorganisms use carbon from harmful organic pollutants as a source of energy, breaking down toxic substances into less toxic or non-toxic substances. There is significant interest in the process of decontamination by bioremediation, as it is a relatively simple process, while being cost-efficient and environmentally friendly. Characterizing petroleum-degrading strains and their metabolic pathways has been proven extremely useful in the enhancement of remediation approaches. A wide variety of microorganisms have been identified with the capability to use the carbon contained in the xenobiotic chemicals of petrochemical waste as their sole source of energy (Cerqueira et al., 2012; Das and Chandran, 2011; Das and Kazy, 2014). Some of these microorganisms not only produce specific enzymes for hydrocarbon degradation, as produce adjuvant molecules, called biosurfactants (BS), that together can contribute to the partial and complete systemic breakdown of the original pollutant (Belgacem et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Owsianiak et al., 2009; Tremblay et al., 2017). Biosurfactants are produced by a wide variety of organisms in a constitutive or induced manner, from various substrates, including sugars, oils, and residues (Chrzanowski et al., 2012; Moro et al., 2018; Pacwa-Plociniczak et al., 2011).

Metagenomic approaches have emerged as a strategy to analyze microbial communities in the environment, enabling access to the genetic potential of microorganisms without the need for cultivation in the laboratory (Mirete et al., 2016).

Through metagenomics, the presence of hydrocarbon-degrading enzymes and microorganisms useful for xenobiotic degradation was evaluated. Additionally, the biodiversity and functional aspects of two different enriched oil-drilling wastes were comparatively analyzed, and the specific sequences and microorganisms involved in hydrocarbon-degradation were identified. The data provided in this study demonstrates the biotechnological potential of this environment.

## 2. Methods

### 2.1. Sample collection

Oil drilling waste (ODW) samples were obtained from one petroleum production well at the onshore Potiguar Basin (Rio Grande

do Norte, Brazil). The Potiguar Basin is located at the Brazilian equatorial margin, covering an area of about 94,043 km<sup>2</sup>. The basin produces an average of 3398.13 m<sup>3</sup> of petroleum per year and constitutes one of the largest Brazilian petroleum producers (ANP, 2016).

### 2.2. Microbial enrichments

ODW (8 g) were homogenized and used as an inoculum for the microbial enrichment cultures. These were grown in a 250 mL Erlenmeyer flask, containing 50 mL Luria-Bertani (LB) (Thermo Fisher Scientific, USA) or Potato Dextrose (PD) medium (potato extract 0.4%; dextrose 2%). Each medium was supplemented with 1% crude oil, in order to increase selective pressure.

The total incubation period for the assays was 21 days, at a temperature of 30 °C. Within that incubation period, the inoculum was transferred to a freshly prepared media every 7 days. After the total incubation period, the LB and PD enrichments (LBE and PDE) were submitted for total DNA extraction. Medium aliquots were separated and stored in 30% glycerol at –80 °C.

### 2.3. DNA extraction and sequencing

Total DNA was extracted from 1.8 mL aliquots of samples using the UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions.

The sequencing libraries were constructed using 100 ng of genomic DNA and the Ion Xpress Plus Fragment library kit (Thermo Fisher Scientific, USA), following the manufacturer's protocols. The genomic DNA was sheared by enzymatic lysis using the Ion Shear Plus Reagents, linked to adapter P1 and to Ion Xpress barcode adapter, and concomitantly nick repaired to complete the connection between the adaptor and DNA insert.

The size-select of the library was performed with the E-Gel SizeSelect 2% agarose (Invitrogen, USA). An amplification reaction was set up in a final volume of 130 µL with the following cycling profile: 95 °C for 5 min; followed by 8 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 15 s, and 70 °C for 60 s. After each step, a purification was performed using magnetic beads on Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP Kit (Beckman Coulter, USA). Template preparation was conducted using the Ion PGM Template OT2 400 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Library was diluted and 26 pM was added to an aqueous master mix containing Ion Sphere Particles (ISPs) using the manufacturer's specified proportions. Emulsion was created using an Ion OneTouch<sup>™</sup> 2 Instrument. After emulsion PCR, DNA positive ISPs were recovered and enriched according to standard protocols. A sequencing primer was annealed to DNA positive ISPs and the sequencing polymerase bound, prior to loading of ISPs into Ion 318 sequencing chip. Sequencing of the sample was conducted according to the Ion PGM<sup>™</sup> Sequencing 400 Kit Protocol (Thermo Fisher Scientific, USA). The run was programmed to include 850 nucleotide flows to deliver 400 base read lengths, on average. The library was sequenced on Ion Torrent Personal Genome Machine.

### 2.4. Taxonomic distribution profile

Metagenomic reads were assigned with the MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST) server (Meyer et al., 2008). In MG-RAST, the species richness was computed as the antilog of the Shannon diversity. The abundance of the microbial communities was identified using the lowest common ancestor (LCA) method with the following parameters: maximum e-value cutoff of 1 e<sup>–5</sup>, a minimum identity of 60% and 15 bp as the minimum alignment length. Statistical analysis for distinct taxonomic levels was performed using the Statistical analyses of

Metagenomic Profiles (STAMP) (Parks and Beiko, 2010) software. Results with  $q < 0.05$  (corrected p-value) were considered significant; unclassified reads were removed from the analysis. The biological relevance of the taxonomic statistics was determined by applying a difference of at least 1% between the proportions.

The RefSeq classification was normalized using count-relative abundances and total Open Reading Frames (ORFs) obtained per metagenome. The statistical significance of relative proportion in taxonomic distribution of LBE and PDE metagenomes was evaluated using the two-sided Fisher's exact test and the standard asymptomatic approach for ratio proportions. Since p-value was not uniformly distributed, Benjamin-Hochberg FDR was applied as a correction method. Results with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 2.5. Functional annotation

Functional profiles were initially identified using the SEED subsystems annotation source of the MG-RAST server, with maximum e-value cutoff of  $1 e^{-5}$ , a minimum identity of 60% and 15 bp as the minimum alignment length. The metabolic pathways of xenobiotics degradation and the annotation of gene sequences involved in the degradation of hydrocarbons and surfactants production were generated using the Biosurfactants and Biodegradation Database (BioSurfDB) (Oliveira et al., 2015). BioSurfDB has a connection between each protein and one or more metabolic pathways, allowing the creation of a histogram of the most abundant metabolic pathways in each sample. The relative functional abundance was determined by considering the total reads for the metabolic pathways and biosurfactants analyzed. The significance of differences in the relative proportions of functional levels, metabolic pathways, and proteins were statistically analyzed in the STAMP software, using the same parameters described for the taxonomic analysis (Parks and Beiko, 2010).

### 2.6. Metagenomic consortia potential for hydrocarbons degradation

The microbial consortia (0.2%) (LBE and PDE) were inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing oil (1%) and 50 mL of LB or PD medium each. The cell growth was monitored for 12 days at 30 °C. The petroleum biodegradation ability of the consortia was evaluated with Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) redox indicator, according to Braddock and Catterall (1999). Each consortium (0.8 OD<sub>600nm</sub>) was inoculated in 5 mL of minimum mineral 1 (MM1) containing the TTC redox indicator and petroleum (1%) as a carbon source. The tubes were incubated at 30 °C for up to 168 h. As negative control, sterile water was used to replace the inoculum. Positive reactions were obtained by observing the color change of the medium. The capacity of producing biosurfactants was evaluated through the emulsification index, drop collapse and oil spreading assays (Belgacem et al., 2015; Cooper and Goldenberg, 1987; Youssef et al., 2004).

### 2.7. Hydrocarbons degradation assay

Metagenomic consortia (LBE and PDE) were evaluated for their biodegradation ability using a mix of aliphatic (C8–C33) and PAHs (anthracene, phenanthrene and pyrene) petroleum hydrocarbons. LBE and PDE were pre-cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of LB or PD medium. This was followed by incubation on a rotatory shaker (180 rpm) at 30 °C for 7 days. The cells were centrifuged (8000 rpm, 10 min, 4 °C) and the pellet was washed twice with sterile distilled water. The pools (1.5 OD<sub>600nm</sub>) were suspended in natural marine water. The cultures were inoculated in

40 mL of sterile natural marine water containing a solution of hydrocarbons (1%) and incubated on a rotatory shaker (180 rpm) at 30 °C for 15 days. Biodegradation negative controls were performed using natural marine water plus hydrocarbon with no addition of microbial inoculum.

### 2.8. Quantitative analysis of hydrocarbons

The glassware was washed with detergent, rinsed in distilled water, ultra-pure water and acetone. Finally, they were kept at 300 °C for 3 h. After 15 days of incubation with the microbial consortia, petroleum hydrocarbon fractions (F1 and F2) were subjected to a liquid-liquid extraction process. The extract was concentrated in a rotary evaporator (40 °C, 800 mbar for 10 min) and submitted to preparative liquid chromatography in order to fractionate (clean) the aliphatic (F1) and aromatic (F2) fractions (Cerqueira et al., 2011; Dörr de Quadros et al., 2016; Jacques et al., 2005). The assays were performed in three replicates and monitored by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID), adapted from Ferreira et al. (2012). The identification of the constituents of fractions F1 and F2 was based on the respective retention times of analytical standards. A mixture of C8–C36 saturated alkanes (Supelco, 1000 µg mL<sup>-1</sup>), Pristane (Sigma-Aldrich, 1000 µg mL<sup>-1</sup>) and Phytane (Sigma-Aldrich, 1000 µg mL<sup>-1</sup>) were used as standards for F1, while a mixture of 16 PAHs standards were used for F2 (Supelco, 2000 µg mL<sup>-1</sup>) (Dörr de Quadros et al., 2016). The aliphatic hydrocarbons and PAHs were analyzed by GC-FID on a PerkinElmer Clarus 600 chromatograph equipped with a Built-in Auto-Sampler injector. The samples were injected (1 µL) in split mode (10:1) and nitrogen carrier gas at constant flow of 1.3 mL min<sup>-1</sup>. The injector and detector temperatures were 280 and 310 °C, respectively. For the F1 fraction, the chromatographic separation was performed on a capillary column (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane, Petrocol® DH 50.2, 50 m, 0.20 mm i.d., x 0.50 µm film thickness). The initial oven temperature was 70 °C during 3 min. The heating ramp was in the rate of 30 °C min<sup>-1</sup> to 310 °C, kept at this temperature for 34 min. For the analysis of fraction F2, the capillary column was the same used for F1, but with the initial oven temperature at 190 °C for 2 min. The heating rate of the first ramp was 8 °C min<sup>-1</sup> to 200 °C for 2 min. The second heating ramp was 10 °C min<sup>-1</sup> to 260 °C for 1 min. For the last ramp, the rate was 15 °C min<sup>-1</sup> to 310 °C and remained for 19.42 min. The quantification of the biodegradation percentages of the F1 and F2 fractions after the incubation period with the microbial consortia was performed using the external standardization method (Aly Salem et al., 2014).

## 3. Results and discussion

### 3.1. The features of oil-drilling waste

ODW is generated in large quantities as a result of oil exploration activities, and is one of the most complex types of residues among those created by the petrochemical industry. The chemical and physical properties of petrochemical waste can vary significantly according to the location of the well, the regional archaeology, the drilling techniques, and the method of disposal (Al-Ansary and Al-Tabbaa, 2007; Hu et al., 2013; Jafarnejad, 2017). The physical, chemical, and organic characteristics of the ODW samples are shown in Table 1.

The ODW used in the experiment is slightly alkaline with a pH of 7.5. The most prevalent metals, arranged in descending order, are Ca (23.83 g dm<sup>-3</sup>), Na (3090 mg dm<sup>-3</sup>), K (793 mg dm<sup>-3</sup>), and Mn (12.01 mg dm<sup>-3</sup>). The sample of ODW collected is classified as "sandy loam", exhibiting low contents of moisture (1.49%) and clay



**Table 1**  
Organic and physical–chemical characteristics of oil-drilling waste (ODW) sample.

Parameters			Granulometry	(g kg <sup>-1</sup> )
pH in water	7.53	(1:25)	Sand	690
Moisture	1.49	(%)	Clay	20
			Silt	290
Organic matter	120.25	(g dm <sup>-3</sup> )	Texture classification	
Ca	23.83		Sandy loam	
Mg	0.43		TPH	
Al	nd		(g kg <sup>-1</sup> )	
H + Al	nd		108.9	
P	1	(mg dm <sup>-3</sup> )		
K	793			
Na	3090			
Fe	6.48			
Zn	1.33			
Cu	1.55			
Mn	12.01			
Ni	0.80			
Pb	1.55			
Cd	0.17			
Cr	0.20			
B	8.83			

TPH: Total Petroleum Hydrocarbons.

Nd: not detected.

(20 g kg<sup>-1</sup>), with a relatively larger proportion of sand (690 g kg<sup>-1</sup>).

The collected sample contained a high quantity of organic matter (120.25 g dm<sup>-3</sup>), most likely due to residue hydrocarbons (108.9 g kg<sup>-1</sup>), shown in Table 1. The detailed composition of the aliphatic and PAHs fractions is available in Table S1. A chemical analysis of the sample revealed that the length of the petroleum hydrocarbons ranged from C8 to C35, with concentrations ranging between 350.7 and 7637.6 mg kg<sup>-1</sup>; this characterizes the residue as having a high oil content (Al-Ansary and Al-Tabbaa, 2007). Aromatic compounds represented only 6.24% of sample hydrocarbons (6.8 g kg<sup>-1</sup>).

Several reports describe microorganisms capable of developing in a multitude of environments, including environments with residues of petrochemical waste, depending on their biotic and abiotic characteristics (Mirete et al., 2016). Properties such as texture, moisture, pH, and nutrient availability, can determine the taxonomic and functional composition of the microorganisms present in this waste (Dörr de Quadros et al., 2016; Sierra-García et al., 2014).

### 3.2. General characteristics of the metagenomes

LBE and PDE metagenomes were generated from ODW. These were analyzed using the MG-RAST server. The whole DNA genome sequencing resulted in 1,007,566 and 1,553,843 reads from LBE and PDE, with a total of 249,315,001 bp and 204,050,838 bp, and an average length of 247 and 131 bp, respectively (Table 2). The reads

**Table 2**  
General characteristics of metagenomes generated by whole genome sequencing.

	Metagenome	
	LBE	PDE
Base pairs (bp)	249,315,001	204,050,838
Number of reads	1,007,566	1,553,843
Length average of reads (bp)	247	131
Ribosomal RNA genes	63,946	115,069
Annotated Proteins	623,193	855,273
Unknown Proteins	130,689	225,972

were deposited in the MG-RAST server with accession numbers 4643476.3 (LBE) and 4643480.3 (PDE). Rarefaction curves were asymptotic for two metagenomes, indicating that the sampling was sufficient to cover the overall richness of sequences. Reads identified as artificial duplicates were automatically removed. After this, 753,882 proteins were predicted for the LBE sample, with approximately 17% of total reads annotated with unknown functions; while 83% were predicted as functionally assigned proteins. For the PDE metagenome, 1,081,245 proteins were predicted, where 21% of sequences corresponded to unknown proteins and 79% of total reads showed functionally (Table 2).

### 3.3. Taxonomic profiles annotation of metagenomes

Microorganisms grow and survive in the natural environment, and the use of an enriched environment can stimulate the population growth of any desired organism (Palková, 2004). For microbial propagation, certain biochemical and biophysical conditions must be provided. An important distinction between the growth media (LB and PD) used in this study is the nutrient composition, which they make available to the microbes. Even though the same samples of ODW were used, the different growth media gave rise to completely different structures.

Table 2 shows a total of 6.35% and 7.41% of the sequences associated with rRNA genes for the LBE and PDE samples, respectively. The species richness estimated through the  $\alpha$ -diversity index showed that the LBE metagenome possessed a diversity of 160, whereas the PDE metagenome possessed a diversity of 49. This much higher diversity in the LBE sample strongly indicates that different environmental enrichments have a significant influence on the microbial composition grown in them.

At the domain level, the majority of reads were assigned to Bacteria for both metagenomes, and no statistical difference was found between them. LBE had a total abundance of 99.8%, while PDE that of 98.7% (Table 3). Concerning the Eukaryota domain, the number of reads was statistically different between each sample, with the PDE sample showing an abundance of 1.18% when compared to LBE, which had one of 0.8%. The Archaeal community was the less abundant fraction within the microbial consortia, with a representation of 0.03% (LBE) and 0.003% (PDE) reads. Previous studies corroborate the results obtained at the domain level. LB broth is the most widely used medium for bacterial growth (Sezonov et al., 2007). In contrast, PD broth is widely recommended for the isolation and enumeration of yeasts and molds (Atlas, 2010). Therefore, it is not surprising that PDE medium showed a higher number of Eukaryota reads (1.18%).

Sequencing data revealed that microbial communities were predominantly composed by the Phylum Proteobacteria (79.6% for LBE and 92.6% for PDE). In the LBE metagenome, Firmicutes represented the second most abundant Phylum (12.1%), followed by Actinobacteria (0.35%); while in the PDE metagenome, the second

**Table 3**  
Comparative taxonomic profile of LBE and PDE metagenomes.

Domain	abundance (%)	
	LBE	PDE
Archaea <sup>a</sup>	0.03	0.003
Bacteria	99.8	98.7
Eukaryota <sup>a</sup>	0.08	1.18
Other sequences <sup>a</sup>	0.001	0.005
Unclassified sequences <sup>a</sup>	0.022	0.001
Viruses <sup>a</sup>	0.012	0.094

<sup>a</sup> Differences statistically significant between LBE and PDE samples ( $p > 0.05$ ) by STAMP.

most abundant Phylum was Actinobacteria (2.7%), followed by Ascomycota (1.0%). Forty-two additional Phyla representing less than 1% of the relative abundance of the microbial communities were also present in both metagenomes. Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria and Actinobacteria (class) were predominant in the PD enrichments.

The results obtained were similar to those in existing reports, where Proteobacteria are the dominant Phylum found in petrochemical waste samples (Dôrr de Quadros et al., 2016; Joshi et al., 2014; Yadav et al., 2015). Members of this phylum have an important role in hydrocarbon degradation processes with diverse metabolic functions (Joshi et al., 2014).

Table 4 shows the 10 most abundant bacterial genera identified in the metagenomics analyzes. This taxonomic distribution was distinct for LBE and PDE metagenomes and statistically significant differences were observed for all genera. In the LB-enriched sample, the main genera found belonged to the prokaryotic group, with abundances of *Pseudomonas* (10.5%), *Bacillus* (6.82%), *Bordetella* (2.51%), *Achromobacter* (1.55%), *Paenibacillus* (0.84%), *Burkholderia* (0.81%), *Xanthomonas* (0.77%), *Pseudoxanthomonas* (0.5%), *Stenotrophomonas* (0.35%), and *Lysinibacillus* (0.34%), which represented approximately 25% of the total abundance of the reads. In the PD-enriched sample, the most frequent genera were *Stenotrophomonas* (26.9%), *Pantoea* (6.3%), *Brevundimonas* (3.65%), *Xanthomonas* (1.47%), *Roseomonas* (0.95%), *Erwinia* (0.63%), *Pseudomonas* (0.42%), *Escherichia* (0.28%), *Clavibacter* (0.18%), and *Enterobacter* (0.16%), these represented around 41% of the total abundance of the reads.

The most commonly found bacteria in ODW enrichments have been previously described as inhabitants of petroleum-associated environments (Chaudhary et al., 2015; Das and Chandran, 2011; Obi et al., 2016). The majority of these genera have common characteristics that can explain their predominance in ODW enrichments, such as the ability to grow in aerobic conditions and to degrade aliphatic and aromatic compounds (Bezza and Chirwa, 2017; Cerqueira et al., 2012; Chaudhary et al., 2015; Choi et al., 2013; Das and Chandran, 2011; Das and Kazy, 2014; Deng et al., 2014; Emtiaz et al., 2005; Mansur et al., 2014; Viñas et al., 2005; Yousaf et al., 2011). Among the assessed organisms, bacteria of the most abundant genera such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* and *Pantoea* are widely reported as an alternative for sustainable treatment of environmental passives (Arslan et al., 2014; Cerqueira et al., 2012; Das and Chandran, 2011; Das et al., 2008; Das and Kazy, 2014; Obi et al., 2016; Vasileva-Tonkova and Gesheva, 2007). Furthermore, some reports have classified these genera as bio-emulsifiers with the potential to increase the bioavailability of hydrocarbons for improved biodegradation.

Concerning the Eukaryota domain, a higher number of reads

was identified in the PDE metagenome (Table S2), with the number of assigned sequences around 15 times higher than that in the LBE sample. The most abundant eukaryotic genera in PDE were *Aspergillus*, *Pyrenophora*, *Phaeosphaeria*, *Aureobasidium*, *Leptosphaeria* and *Penicillium*, while for LBE, all genera represented less than 0.002% of abundance. The biodegradation of hydrocarbons in the environment has been reported by several species of fungi, with an efficiency of up to 90% (Cerniglia and Sutherland, 2010). It has been reported by Singh (2006), that fungi such as *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Aureobasidium* can be potential degraders of crude oil.

The heterogeneous microbial diversity reported in the samples show strong potential with regards to the remediation of environments contaminated by petroleum hydrocarbons. Different microorganisms provide distinct levels of hydrocarbon degradation. Associations of microorganisms increase their ability to utilize a large number of hydrocarbons as a sole carbon source for survival. These microorganisms can completely mineralize petroleum compounds through the metabolic actions of one or more strains (Jacques et al., 2005; Kadali et al., 2012; Oliveira et al., 2017). Furthermore, even if many microorganisms do not solely survive on oil/petroleum hydrocarbons, they still contribute to the overall microorganism community with their unique metabolic pathways. Literature has extensively described that hydrocarbonoclastic bacteria are not the only ones capable of degrading hydrocarbons and/or producing biosurfactants (Chronopoulou et al., 2015; Schneiker et al., 2006).

In this way, the application of mixed cultures in the ODW-contaminated environments has shown to be more advantageous than pure cultures, due to the effect of synergistic interactions between members of association. Complete degradation of hydrocarbons involves the use of microbial consortia including prokaryotic and eukaryotic forms (Head et al., 2006; Guerra et al., 2018; Kostka et al., 2011; Owsianiak et al., 2009; Rizzo et al., 2006; Tremblay et al., 2017).

### 3.4. Comparative functional profiles

To reveal the microbial functional profile of the enriched samples, the reads were annotated according to the SEED subsystems database. The major metabolic and functional protein profiles were similar for the two metagenomic samples, in terms of the percentages of genes identified (Fig. 1).

At level 1, the clustering-based subsystem was the most predominant subsystem found in both metagenomes, which corresponds to groups of hypothetical protein families (Fig. 1). In total, 4371 ORFs were identified for the LBE metagenome; 13.8% of these ORFs corresponded to hypothetical proteins with unknown functions, and 86.2% were assigned to specific proteins. Concerning the PDE metagenome, 4163 ORFs were identified; 13.7% of these ORFs were hypothetical, and 86.3% were allocated to specific proteins (Fig. 1). These wide percentages of proteins with unknown functions indicate the enormous biotechnological potential of these ODW enrichments, which could lead to the elucidation and understanding of additional hydrocarbon-degradation pathways, as well as new enzymes.

The distribution pattern of the assigned proteins highlights the significant dominance of carbohydrates and amino acid subsystems, along with 24.3% and 23.8% of the total abundance for LBE and PDE metagenomes, respectively (Fig. 1).

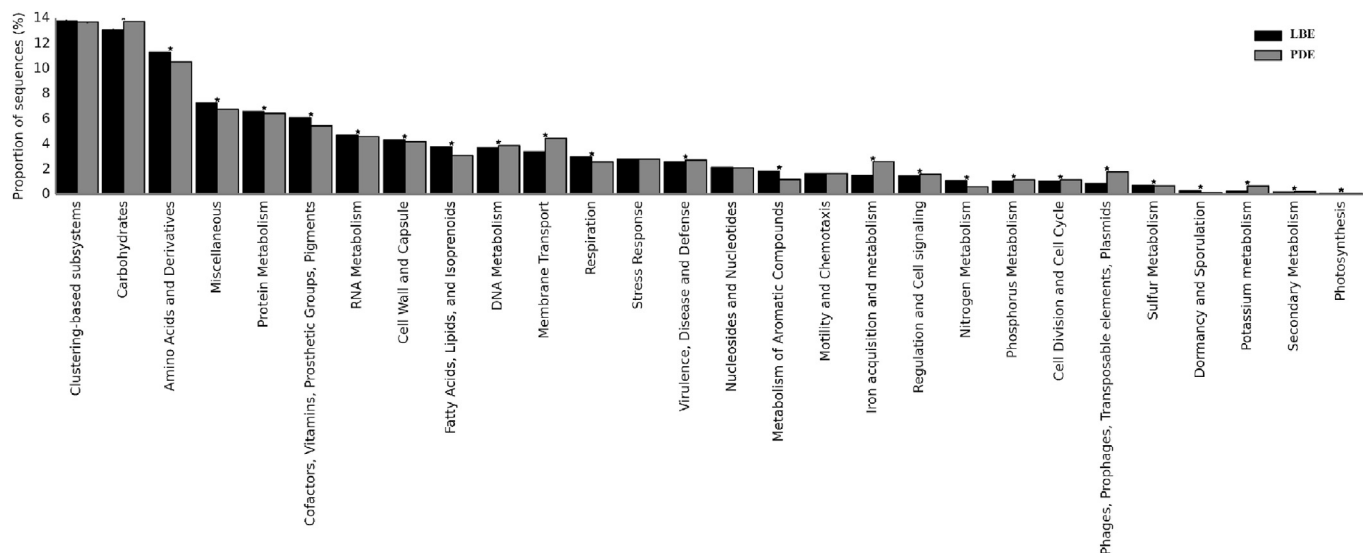
The predominance of proteins belonging to these subsystems may indicate the ability of the PDE and LBE metagenomes to obtain energy from different conditions and substrates. These features are crucial for microbial survival and adaptation in polluted environments.

The functional analysis also allows for the classification of

**Table 4**  
Evaluation of the 10 most abundant genera of LBE and PDE metagenomes.

	abundance (%)	
	LBE <sup>a</sup>	PDE <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas</i>	10.5	<i>Stenotrophomonas</i> 26.9
<i>Bacillus</i>	6.82	<i>Pantoea</i> 6.63
<i>Bordetella</i>	2.51	<i>Brevundimonas</i> 3.65
<i>Achromobacter</i>	1.55	<i>Xanthomonas</i> 1.47
<i>Paenibacillus</i>	0.84	<i>Roseomonas</i> 0.95
<i>Burkholderia</i>	0.81	<i>Erwinia</i> 0.63
<i>Xanthomonas</i>	0.77	<i>Pseudomonas</i> 0.42
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.50	<i>Escherichia</i> 0.28
<i>Stenotrophomonas</i>	0.35	<i>Clavibacter</i> 0.18
<i>Lysinibacillus</i>	0.34	<i>Enterobacter</i> 0.16

<sup>a</sup> Differences statistically significant between LBE and PDE samples ( $p > 0.05$ ) by STAMP.



**Fig. 1.** Functional assignment of the metagenomes using the SEED subsystem database. \*Differences statistically significant between LBE and PDE samples ( $p > 0.05$ ), as obtained by STAMP.

subsystems into differing subsystems related to the essential metabolic processes in both metagenomes. Thus, more than 25% of the total metagenomic genes were assigned to the metabolism of proteins, cofactors, RNA, fatty acids, DNA, aromatic compounds, and iron. In contrast, some subsystems were underrepresented in the metagenomics data, including sequences involved in photosynthesis, secondary metabolism, dormancy, and potassium metabolism (Fig. 1).

Biodegradation of petroleum hydrocarbons occurs gradually through the sequential metabolism of its compounds. The functional diversity found in ODW samples contributes towards the enzymatic flexibility of microorganisms in the transformation of contaminants into non-harmful final products, which can then be incorporated into natural biogeochemical cycles (Cerniglia and Sutherland, 2010; Fuchs et al., 2011; Peixoto et al., 2011; Rojo, 2009). To summarize, our results indicate a versatile potential for metagenomes in aiding the process of hydrocarbon degradation.

### 3.5. Hydrocarbon degradation functions

The BioSurfDB database was also used to evaluate the specific functional composition of the ODW metagenomes. The metabolic and biosynthesis pathways identified were similar to those found using the SEED database (Fig. 2). Several metabolic pathways are related to the aerobic degradation of both aliphatic and aromatic hydrocarbons compounds by microorganisms. Aerobic catabolism is generally faster because of the metabolic advantage of the availability of  $O_2$  as the main electron acceptor.

An in-depth examination of the xenobiotic metabolic pathways revealed the predominance of subgroups as benzoate, fatty acid, xylene, aromatic compounds, chloroalkane, and chloroalkene degradation pathways and methane metabolism with a significant number of putative genes potentially involved in the metabolism of hydrocarbons (Fig. 2A). In total, more than 54% of the sequences annotated belonged to these main categories. Besides that, approximately 15% of the identified genes were related to naphthalene, aminobenzoate, chlorocyclohexane, chlorobenzene, styrene and toluene degradation pathways. Additional pathways, such as fluorobenzoate, nitrotoluene and propanoate, representing less than 1% of the total abundance were also present in both metagenomes. The majority of sequences found in our metagenomes for

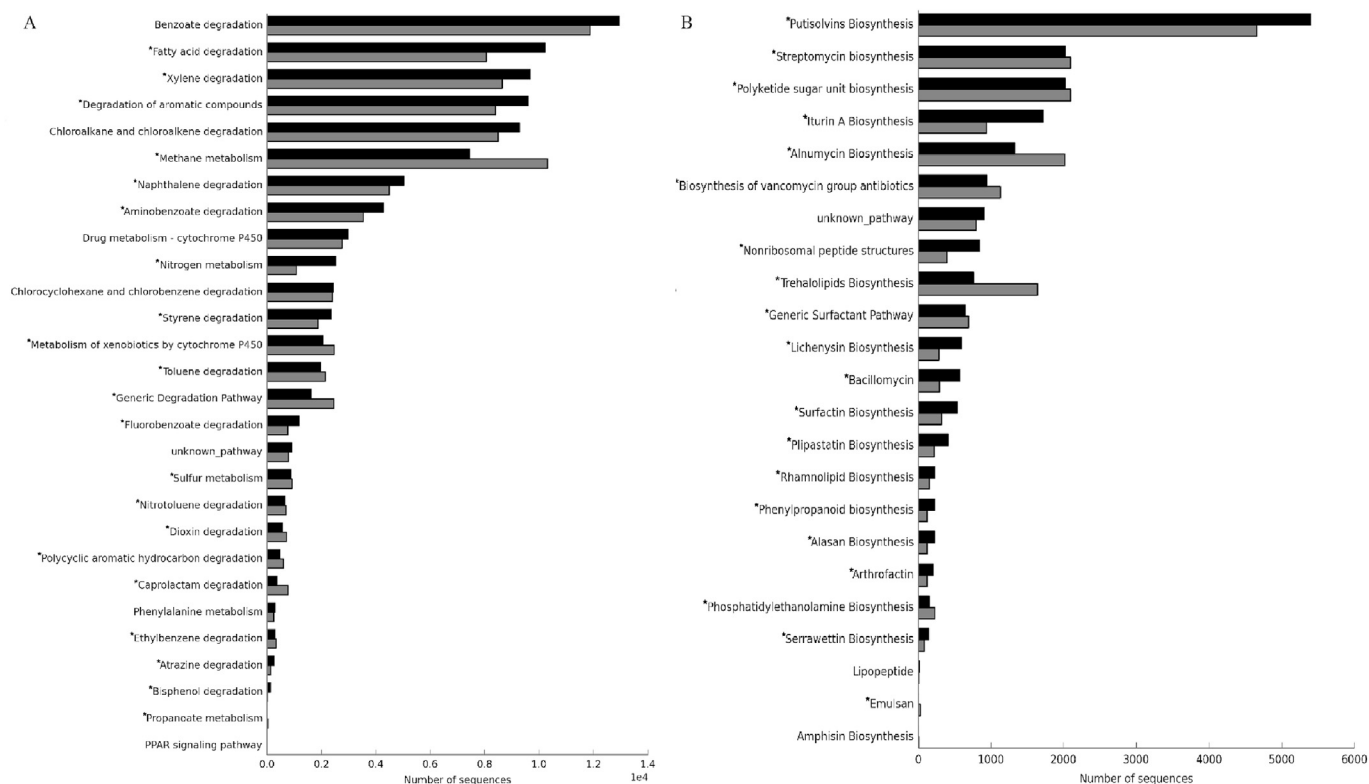
linear and aromatic hydrocarbons mineralization related to  $O_2$ -dependent degradation are shown in Table 5.

Aromatic compounds represent the second most abundant organic compounds in nature, following carbohydrates, and comprises one-quarter of the earth's biomass. Consequently, benzoate is recognized as a model compound for the catabolism of aromatic rings (Fuchs et al., 2011). The classical aerobic degradation of aromatic hydrocarbons usually generates intermediate compounds by hydroxylation, such as catechol (1,2-dihydroxybenzene) or protocatechuate (3,4-dihydroxybenzoate) (Fuchs et al., 2011). The intermediates may then be dearomatized by the action of enzymes known as oxygenases. Monooxygenases and dioxygenases enzymes perform the addition of molecular oxygen atoms to the aromatic ring with subsequent cleavage of these compounds. The cleavage of ring intermediates is performed in two forms by ortho- or meta-cleavage dioxygenases. After cleavage of the aromatic compounds, they are transformed into metabolic pathway intermediates of the tricarboxylic acid (Krebs Cycle) cycle, such as succinate, pyruvate and acetyl-CoA, which can be completely degraded into  $CO_2$  (Fuchs et al., 2011; Peixoto et al., 2011).

We identified a high number of oxygenases enzymes (190 and 135, for LBE and PDE, respectively), as catechol 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase, protocatechuate 3,4-dioxygenase and protocatechuate 4,5-dioxygenase genes in both metagenomic samples (Table 5). Catechol intermediates are produced during bacterial degradation, whereas protocatechuate is generated in most fungi and some bacterial peripheral pathways (Fuchs et al., 2011). Our results corroborate these findings, as a superior read abundance was found for catechol enzymes in the LBE metagenome, whereas protocatechuate enzymes were more prevalent in the PDE metagenome.

Moreover, Fig. S1 shows the distinct abundance for each metagenome of specific genes of the benzoate degradation pathway. By analyzing this specific pathway, we can also observe that some enzymes were predicted specifically for either the LBE or the PDE metagenome.

We observed a broad potential for the degradation of aliphatic compounds, most likely due to the predominant composition of linear hydrocarbons in ODW, and the addition of crude oil in the initial enrichment (Fig. 2A). The main constituents of crude oil are alkanes, which are extremely reduced molecules with a high



**Fig. 2.** Specific functional profile of the enriched ODW metagenomes for (A) xenobiotic degradation pathways and (B) biosurfactants biosynthesis. The reads were annotated according to SEED subsystems database. \*Differences statistically significant between LBE and PDE samples ( $p > 0.05$ ) as obtained by STAMP.

**Table 5**

Enzymes discovered in microbial enrichments related to different hydrocarbon degradative pathways.

Enzymes	LBE (reads)	PDE (reads)
Aldehyde dehydrogenase	1273	373
Alcohol dehydrogenase	1088	315
Alkane monooxygenase	207	36
Benzene 1,2-dioxygenase	44	28
Benzoate 1,2-dioxygenase	114	22
Biphenyl 2,3-diol-1,2-dioxygenase	114	44
Carbon-monoxide dehydrogenase	331	116
Catalase	411	82
Catechol 1,2-dioxygenase	45	4
Catechol 2,3-dioxygenase	33	10
Ferredoxin	290	88
Methanol dehydrogenase	199	58
Naphthalene dioxygenase	98	21
Nitrilase	167	182
P450 monooxygenase	57	3
Peroxioredoxin	141	59
Phenol hydroxylase	353	121
Phenylacetaldehyde dehydrogenase	409	101
Pentachlorophenol 4-monooxygenase	81	9
Protocatechuate 2,3-dioxygenase	4	0
Protocatechuate 3,4-dioxygenase	37	66
Protocatechuate 4,5-dioxygenase	6	6
Salicylaldehyde dehydrogenase	153	62
Xylene monooxygenase	15	4
Hypothetical protein	2684	156
Unknown protein	459	224
Total	8813	2190

energy and carbon content; they act as good carbon and energy sources for microorganisms (Wang and Shao, 2013). Catabolism of saturated aliphatic hydrocarbons is generally described by the

oxidation of a terminal methyl group to produce an alcohol, which is then further oxidized to the equivalent aldehyde, and finally converted into a fatty acid. Fatty acids are further processed to acetyl-CoA, which is metabolized in the citric acid cycle and finally oxidized to CO<sub>2</sub> and water (Fuchs et al., 2011; Peixoto et al., 2011).

Several enzymes related to the degradation of alkanes like aldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, alkane hydroxylase, methane monooxygenase, and enzymes that belong to a family of soluble cytochrome P-450 were present in the metagenomes (Table 5). In addition, we identified a significant number of proteins involved with synthesis of biosurfactants (18.14 and 17.92% for LBE and PDE, respectively). The predominant pathways of biosurfactants biosynthesis (approximately 63%) belonged to putisolvins, streptomycin, polyketide sugar unit, iturin A, and alnumycin for both metagenomes (Fig. 2B).

Several bacteria that are able to degrade hydrocarbons also produce biosurfactants of diverse chemical structure that allow for the emulsification of low solubility compounds (Banat et al., 2010; Franzetti et al., 2010; Oliveira et al., 2017). Biosurfactants are reported to act in several ways to provide bacteria with an advantage, for instance by having antibiotic properties, providing motility, promoting biofilm development, or acting as adjuvants in the degradation of heavy oils (Belgacem et al., 2015; Chrzanowski et al., 2012; Franzetti et al., 2010; Ławniczak et al., 2013; Moro et al., 2018). Although the precise mechanism of degradation enhancement by surfactants is still unclear, and recent articles state opposite ideas, it is also accepted that production of biosurfactants and biodegradation of hydrocarbons are correlated events as we are showing (Chrzanowski et al., 2012; Dell'Anno et al., 2018; Kumari et al., 2018; Owsianiak et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Roy et al., 2018; Souza et al., 2014; Suganthi et al., 2018; Tremblay et al., 2017).

As seen in Fig. 2B, both media allowed production of

biosurfactants, only with slight differences in the gene diversity. The efficiency of biosurfactant production is dependent on the carbon source, nitrogen, and trace elements (Banat et al., 2010; Janek et al., 2013; Moro et al., 2018), and so it is possible that the medium composition has favored the increased production of some biosurfactants.

The pathway for putisolvin was significantly more abundant in our metagenomes and this biosurfactant have often been reported to be produced by *Pseudomonas* spp. (Janek et al., 2013), the first most abundant genus found in the LBE (see Table 4). Moreover, amongst the most efficient biosurfactant-producing microorganisms are those from the genus *Bacillus*, the second most abundant in the LBE consortia. This genus are frequently reported as being the largest producers of lipopeptide biosurfactants, mainly due to its ability to produce cyclic lipopeptides bearing a long acyclic side chain (Chakraborty and Das, 2014.). The three main families of lipopeptides produced by *Bacillus* spp. are surfactins, iturins, and fengycins (Geissler et al., 2017).

### 3.6. Hydrocarbon assimilation by metagenomics samples

In order to assess the hydrocarbon assimilation potential, the microbial growth behaviors of LBE and PDE in cultures containing 1% crude oil were evaluated (Fig. S2). The assay was monitored for 12 days and both metagenomic consortia demonstrated the ability to grow in the conditions used. A period of 7 days for pre-cultivation was chosen for the subsequent experiments, as this is the time during which the cells are experiencing exponential growth. Interestingly, PDE demonstrated a cellular growth 4 times higher than that of LBE after 7 days of culture (Fig. S2).

The ability of the two consortia to metabolize the hydrocarbons was initially assessed using the TTC indicator redox method. Positive results are shown in Table S3. This methodology is based on the

microorganism's expression of its own metabolic activity through the use and degradation of the contaminant as a source of carbon, and, hence, energy. This indicator then becomes an artificial acceptor of electrons, replacing oxygen, necessary for aerobic metabolism in the compounds (Braddock and Catterall, 1999; Richard and Vogel, 1999). It is also an important indicator of intracellular enzymes, such as dehydrogenases, which have the ability to catalyze redox reactions of organic compounds (Olga et al., 2008).

Several biosurfactants were identified in the samples, which reflect the detection of potential biosurfactant producers (Table S4). Both enrichments showed satisfactory results for the emulsification rate (>60%) and oil spreading. However, only the LBE consortia were positive for the other tests: drop collapse and hemolytic activity. These results corroborate the functional data, where we observed a high predominance of biosurfactant genes. We can therefore suggest that there is a significant production of surfactants by the metagenomes (Fig. 2B). The most abundant genes in each metagenome for biosurfactant synthesis are described in Table S5. In general, the LBE metagenome presented an increased versatility for the production of biosurfactants.

According to the preliminary results suggesting the degradative capacity of the microbial enrichments, we evaluated the effectiveness of bioremediation concerning the enriched metagenomic consortia after 15 days of bioaugmentation treatment in contaminated seawater with aliphatic and aromatic hydrocarbon solution (1%) (Fig. 3). The microbial consortia from the two enrichments were applied and evaluated as a decontamination strategy for the hydrocarbon-polluted marine environment. Fig. 3A and B show the percentage of biodegradation of a wide range of aliphatic hydrocarbons (C8–C33), for LBE and PDE, respectively. The most efficient n-alkane degradation occurred at the fraction between C8–C12 chains for both enrichments (above 95%).

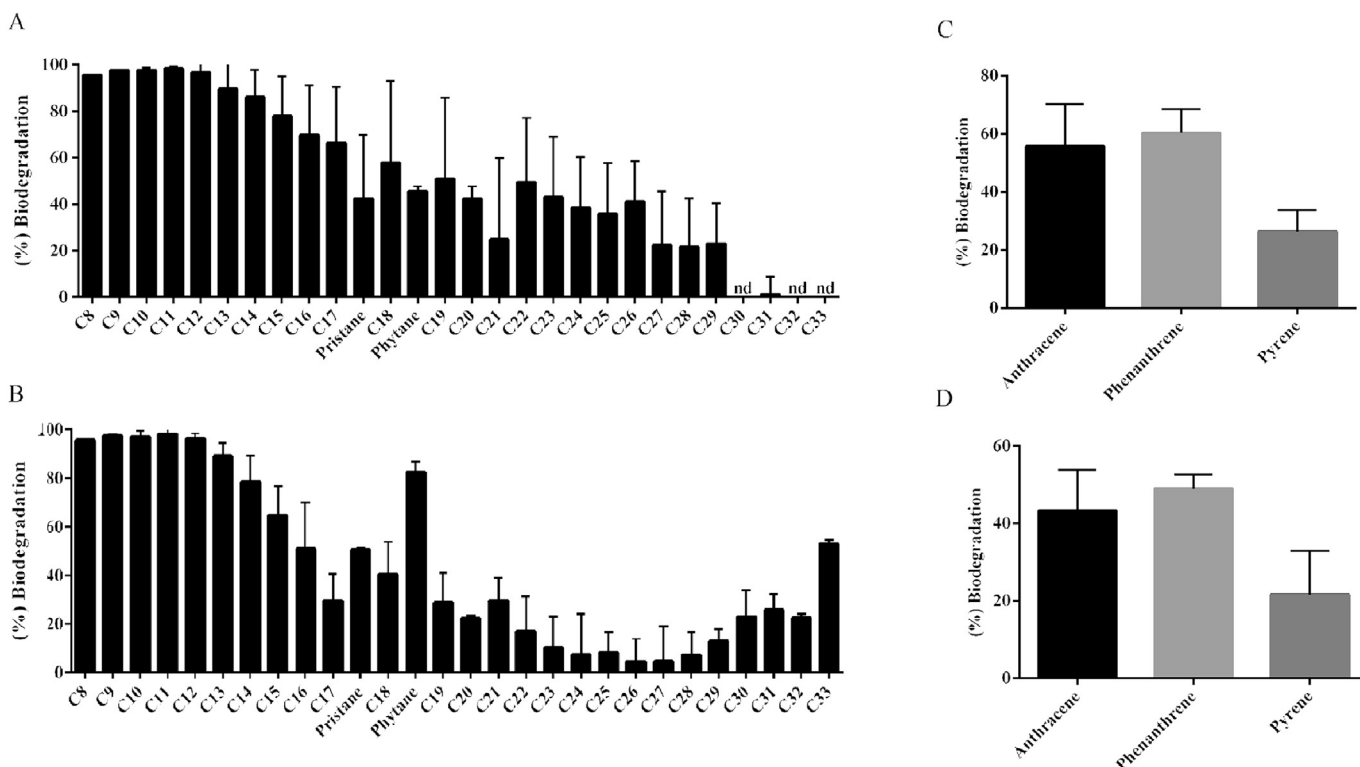


Fig. 3. Qualitative assessment of enriched oil-drilling samples for the removal of representative hydrocarbon compounds. Aliphatic hydrocarbon degradation by (A) LBE and (B) PDE metagenomes. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by (C) LBE and (D) PDE metagenomes.

The PDE enrichment showed superior degradation for the C13, C14, and C15 chains, as well as phytane (65–89%). Interestingly, the compound with C33 also appeared with a high rate of degradation in this consortium (53%), while the other hydrocarbon chains (C19–C32) remained lower (Fig. 3B). On the other hand, the mineralization of n-alkanes with C13–C19 reached the highest degradation percentages (51–90%) by LBE enrichment (Fig. 3A). This sample also demonstrated a greater metabolic capacity for the long hydrocarbon chains (C22–C29) when compared to the PDE inoculum.

In addition, due to the promising data found for aromatic compound metabolism, three PAHs were selected to evaluate the degradation rate (Fig. 3C and D). Our results showed degradation efficiencies in total of about 46.4 and 37.9% after 15 days of treatment, for LBE and PDE, respectively. The bioaugmentation with LBE specifically demonstrated greater effectiveness for anthracene (55.7%), phenanthrene (60.2%) and pyrene (23.3%) (Fig. 3C) when compared with PDE (43.3%, 48.9% and 21.5%, respectively) (Fig. 3D).

According to Mohamed et al. (2006), the biodegradability of petroleum components follows a preferred order of degradation: n-alkanes > branched alkane chains > branched alkenes > monoaromatic > cycloalkanes > polyaromatic > asphaltene chains. In this way, the degradation of long chains of carbon and aromatic rings is difficult in the short-term. Our results for the bioremediation treatments is in accordance with our functional data and are considered satisfactory, especially when compared with the short time used for the degradation of petroleum hydrocarbons (Cerqueira et al., 2011; Dörr de Quadros et al., 2016).

#### 4. Conclusion

This study presents a practical method for understanding microbial communities in ODW. The comparative metagenomics approach used in this study demonstrates the effect of different enrichment conditions on the composition of microbial communities and enzymatic apparatus. The LBE enrichment exhibited a superior degradation capacity, most likely due to a higher abundance related to degradation genes of xenobiotics. The microbial community structure and degradative pathways generated in this study could be used to further enhance existing bioremediation strategies.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.068>.

#### References

- Al-Ansary, M.S., Al-Tabbaa, A., 2007. Stabilisation/solidification of synthetic petroleum drill cuttings. *J. Hazard Mater.* 141, 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.079>.
- Aly Salem, D.M.S., Morsy, F.A.-E.M., El Nemr, A., El-Sikaily, A., Khaled, A., 2014. The monitoring and risk assessment of aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Red Sea, Egypt. *Egypt J. Aquat. Res.* 40, 333–348. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.11.003>.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis, 2016. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2016. Rio de Janeiro, p. 265. ISSN 1983–5884.
- Arslan, M., Afzal, M., Amin, I., Iqbal, S., Khan, Q.M., 2014. Nutrients can enhance the abundance and expression of alkane hydroxylase CYP153 gene in the rhizosphere of ryegrass planted in hydrocarbon-polluted soil. *PLoS One* 9, e111208.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111208>.
- Atlas, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media*. CRC press.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., et al., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444.
- Belgacem, B.Z., Bijttebier, S., Verreth, C., Voorspoels, S., Van de Voorde, I., Aerts, G., Willems, K.A., Jacquemyn, H., Ruyters, S., Lievens, B., 2015. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1370–1384. <https://doi.org/10.1111/jam.12799>.
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2017. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. *J. Hazard Mater.* 321, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.035>.
- Braddock, J.F., Catterall, P.H., 1999. A simple method for enumerating gasoline- and diesel-degrading microorganisms. *Bioremediat. J.* 3, 81–84. <https://doi.org/10.1080/1088986991219226>.
- Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B., 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 2079–2110. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_151](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_151).
- Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A.O., do Peralba, M.C.R., Bento, F.M., 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour. Technol.* 102, 11003–11010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.074>.
- Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Camargo, F.A.O., do Peralba, M.C.R., Bento, F.M., 2012. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1203–1222. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0923-z>.
- Chakraborty, J., Das, S., 2014. Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. In: Das, S. (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, India, pp. 167–191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00007-8>.
- Chaudhary, P., Sahay, H., Sharma, R., Pandey, A.K., Singh, S.B., Saxena, A.K., Nain, L., 2015. Identification and analysis of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)—biodegrading bacterial strains from refinery soil of India. *Environ. Monit. Assess.* 187, 391. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4617-0>.
- Choi, E.J., Jin, H.M., Lee, S.H., Math, R.K., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2013. Comparative genomic analysis and benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylene (BTEX) degradation pathways of *Pseudoxanthomonas* sp. BD-a59. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 663–671. <https://doi.org/10.1128/AEM.02809-12>.
- Chronopoulou, P.-M., Sanni, G.O., Silas-Olu, D.I., van der Meer, J.R., Timmis, K.N., Brussaard, C.P.D., McGenity, T.J., 2015. Generalist hydrocarbon-degrading bacterial communities in the oil-polluted water column of the North Sea. *Microb. Biotechnol.* 8, 434–447. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12176>.
- Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., Czaczky, K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 401–419. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0854-8>.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 224–229.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.
- Das, R., Kazy, S.K., 2014. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7369–7389. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2640-2>.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2008. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 72, 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.015>.
- de Rizzo, A.C.L., Leite, S.G.F., Soriano, A.U., dos Santos, R.L.C., Sobral, L.G.S., 2006. *Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores*.
- Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., Dell'Anno, A., 2018. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: current knowledge and future perspectives. *Mar. Environ. Res.* 137, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>.
- Deng, M.-C., Li, J., Liang, F.-R., Yi, M., Xu, X.-M., Yuan, J.-P., Peng, J., Wu, C.-F., Wang, J.-H., 2014. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Mar. Pollut. Bull.* 83, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.018>.
- Dörr de Quadros, P., Cerqueira, V.S., Cazarolli, J.C., do Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., Giongo, A., Bento, F.M., 2016. Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 115, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.018>.
- Emtiazi, G., Shakarami, H., Nahvi, I., Mirdamadian, S.H., 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *E. coli*. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 172.
- Ferreira, V.R., Gouveia, C.D., da Silva, C.A., Fernandes, A.N., Grassi, M.T., 2012. Optimization of an analytical protocol for the extraction, fractionation and determination of aromatic and aliphatic hydrocarbons in sediments. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 1460–1468. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012005000010>.
- Franzetti, A., Tamburini, E., Banat, I.M., 2010. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672,

- 121–134.
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803–816.
- Geissler, M., Oellig, C., Moss, K., Schwack, W., Henkel, M., Hausmann, R., 2017. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *J. Chromatogr. B* 1044, 214–224.
- Guerra, A.B., Oliveira, J.S., Silva-Portela, R.C.B., Araújo, W., Carlos, A.C., Vasconcelos, A.T.R., Freitas, A.T., Domingos, Y.S., de Farias, M.F., Fernandes, G.J.T., Agnez-Lima, L.F., 2018. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environ. Pollut.* 235, 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.014>.
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 173.
- Hu, G., Li, J., Zeng, G., 2013. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: a review. *J. Hazard Mater.* 261, 470–490. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>.
- Jacques, R.J.S., Santos, E.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., Selbach, P.A., Sá, E.L.S., Camargo, F.A.O., 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 56, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.06.005>.
- Jafarnejad, S., 2017. 2-Pollutions and Wastes from the Petroleum Industry BT - Petroleum Waste Treatment and Pollution Control. Butterworth-Heinemann, pp. 19–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809243-9.00002-X>.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Krasowska, A., 2013. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 110, 379e386. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.008>.
- Joshi, M.N., Dhebar, S.V., Dhebar, S.V., Bhargava, P., Pandit, A., Patel, R.P., Saxena, A., Bagatharia, S.B., 2014. Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. *Arch. Microbiol.* 196, 531–544. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0992-0>.
- Kadali, K.K., Simons, K.L., Sheppard, P.J., Ball, A.S., 2012. Mineralisation of weathered crude oil by a hydrocarbonoclastic consortia in marine mesocosms. *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 4283–4295. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1191-8>.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgado, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M., 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7962–7974. <https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11>.
- Kumari, S., Regar, R.K., Manickam, N., 2018. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresour. Technol.* 254, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>.
- Mansur, A.A., Adetutu, E.M., Kadali, K.K., Morrison, P.D., Nurulita, Y., Ball, A.S., 2014. Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10725–10735. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3018-1>.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E.M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., Edwards, R.A., 2008. The metagenomics RAST server — a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinf.* 9, 386. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>.
- Mirete, S., Morgante, V., González-Pastor, J.E., 2016. Functional metagenomics of extreme environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.017>.
- Mohamed, M., Al-dousary, M., Hamzah, R., e Fuchs, G., 2006. Isolation and characterization of indigenous thermophilic bacteria active in natural attenuation of bio-hazardous petrochemical pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58, 213–223.
- Moro, G.V., Almeida, R.T.R., Napp, A.P., Porto, C., Pilau, E.J., Ludtke, D.S., Moro, A.V., Vainstein, M.H., 2018. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13276>.
- Obi, L.U., Atagana, H.L., Adeleke, R.A., 2016. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *SpringerPlus* 5, 1946. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3617z>.
- Olga, P., Petar, K., Jelena, M., Srdjan, R., 2008. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. *J. Microbiol. Meth.* 74, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.012>.
- Oliveira, J.S., Araújo, W., Lopes Sales, A.L., de Brito Guerra, A., da Silva Araújo, S.C., de Vasconcelos, A.T.R., Agnez-Lima, L.F., Freitas, A.T., 2015. BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. *Database J. Biol. Databases Curation* 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav033>.
- Oliveira, J.S., Araújo, W., Figueiredo, R.M., Silva-Portela, R., Guerra, A., Araújo, S., Minnicelli, C., Cardoso Carlos, A., Tereza Ribeiro de Vasconcelos, A., Teresa Freitas, A., Agnez-Lima, L., 2017. Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation. *BMC Microbiol.* <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1077-4>.
- Owsianiak, M., Szulc, A., Chrzanowski, L., Cyplick, P., Bogacki, M., Olejnik-Schmidt, A.K., Heipieper, H.J., 2009. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 545–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2040-6>.
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>.
- Palková, Z., 2004. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO Rep.* 5, 470–476. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400145>.
- Parks, D.H., Beiko, R.G., 2010. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26, 715–721.
- Peixoto, R.S., Vermelho, A.B., Rosado, A.S., 2011. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzym. Res.* 2011, 475193. <https://doi.org/10.4061/2011/475193>.
- Richard, J.Y., Vogel, T.M., 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 44, 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00062-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00062-1).
- Rojó, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 11, 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>.
- Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., Saha, A., Sarkar, P., Sar, P., Kazy, S.K., 2018. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresour. Technol.* 253, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.004>.
- Schneider, S., dos Santos, V.A.P.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T.N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C., Goesmann, A., Golyshina, O.V., Kaminski, F., Khachane, A.N., Lang, S., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Nechitaylo, T., Pühler, A., Regenhardt, D., Rupp, O., Sabirova, J.S., Selbitschka, W., Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Vorhölter, F.-J., Weidner, S., Kaiser, O., Golyshin, P.N., 2006. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat. Biotechnol.* 24, 997.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
- Sierra-García, I.N., Correa Alvarez, J., Pantaroto de Vasconcelos, S., Pereira de Souza, A., dos Santos Neto, E.V., de Oliveira, V.M., 2014. New hydrocarbon degradation pathways in the microbial metagenome from Brazilian petroleum reservoirs. *PLoS One* 9, e90087.
- Singh, H., 2006. Introduction. In: *Mycoremediation*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–28. <https://doi.org/10.1002/0470050594.ch1>
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., De Souza Oliveira, R.P., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>.
- Suganthi, S.H., Murshid, S., Sriram, S., Ramani, K., 2018. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *J. Environ. Manag.* 220, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.120>.
- Tremblay, J., Yergeau, E., Fortin, N., Cobanli, S., Elias, M., King, T.L., Lee, K., Greer, C.W., 2017. Chemical dispersants enhance the activity of oil- and gas condensate-degrading marine bacteria. *ISME J.* 11, 2793–2808. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.129>.
- Vasileva-Tonkova, E., Gesheva, V., 2007. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. During growth on hydrocarbons. *Curr. Microbiol.* 54, 136–141. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0345-6>.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M., 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7008–7018. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>.
- Wang, W., Shao, Z., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Front. Microbiol.* 4, 116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00116>.
- Yadav, T.C., Pal, R.R., Shastri, S., Jadeja, N.B., Kapley, A., 2015. Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. *Bioresour. Technol.* 188, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.141>.
- Yousaf, S., Afzal, M., Reichenauer, T.G., Brady, C.L., Sessitsch, A., 2011. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environ. Pollut.* 159, 2675–2683. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.031>.
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 56, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.00>.
- Ławniczak, Ł., Marecik, R., Chrzanowski, Ł., 2013. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2327–2339. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4740-1>.

**Comparative Metagenomics Reveals Different Hydrocarbon Degradative Abilities  
from Enriched Oil-Drilling Waste**

Amanda P. Napp<sup>1</sup>, José Evandro S. Pereira<sup>1</sup>, Jorge S. Oliveira<sup>2,3</sup>, Rita C. B. Silva-Portela<sup>3</sup>,  
Lucymara F. Agnez-Lima<sup>3</sup>, Maria C. R. Peralba<sup>4</sup>, Fátima M. Bento<sup>5</sup>, Luciane M. P.  
Passaglia<sup>6</sup>, Claudia E. Thompson<sup>1,7</sup>, Marilene H. Vainstein<sup>1,\*</sup>.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**



## Supplementary Table 1

Table S1. Composition of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in sample of oil-drilling waste (ODW).

Aliphatics	C number	Mean		Aromatic rings	Mean mg kg <sup>-1</sup>
		mg kg <sup>-1</sup>	PAHs		
Octane	C8	388.1	Naphthalene	2	nd
Nonane	C9	385.7	Acenaphthene	3	439.9
Decane	C10	350.7	Acenaphthylene	3	109.2
Undecane	C11	470.3	Fluorene	3	204.9
Dodecane	C12	471.8	Phenathrene	3	152.5
Tridecane	C13	1364.6	Anthracene	3	1493.6
Tetradecane	C14	4917.8	Fluoranthene	4	899.3
Pentadecane	C15	4840.8	Pyrene	4	128.4
Hexadecane	C16	4672.2	Benz[ <i>a</i> ]anthracene	4	864.1
Heptadecane	C17	5328.7	Chrysene	4	81,5
Octadecane	C18	6128.2	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthene	5	2137.9
Nonadecane	C19	6096.3	Benzo[ <i>k</i> ]fluoranthene	5	237.2
Pristane	C19	5421.6	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	5	nd
Eicosane	C20	7637.6	Dibenzo[ <i>a,h</i> ]anthracene	5	83.0
Phytane	C20	6607.7	Benzo[ <i>g,h,i</i> ]perylene	6	nd
Heneicosane	C21	6676.7	Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pyrene	6	nd
Docosane	C22	5965.6			
Tricosane	C23	5775.3			
Tetracosane	C24	5300.6			
Pentacosane	C25	6407.0			
Hexacosane	C26	3690.6			
Heptacosane	C27	3225.6			
Octacosane	C28	2627.6			
Nonacosane	C29	1995.7			
Hentriacontane	C30	1544.7			
Dotriacontane	C31	985.2			
Tritriacontane	C32	1042.9			
Tetratriacontane	C33	584.6			
Triaccontane	C34	726.5			
Pentatriacontane	C35	433.1			

nd: not detected.

## Supplementary Table 2

Table S2. Evaluation of the 10 most abundant Eukayota of LBE and PDE metagenomes.

	abundance (%)	
	LBE*	PDE*
<i>Sordaria</i>	0.0020	<i>Aspergillus</i> 0.0199
<i>Penicillium</i>	0.0012	<i>Pyrenophora</i> 0.0197
<i>Aspergillus</i>	0.0002	<i>Phaeosphaeria</i> 0.0157
<i>Ajellomyces</i>	0.0002	<i>Aureobasidium</i> 0.0149
<i>Filobasidiella</i>	0.0002	<i>Leptosphaeria</i> 0.0111
<i>Metarhizium</i>	0.0002	<i>Penicillium</i> 0.0109
<i>Magnaporthe</i>	0.0002	<i>Botryotinia</i> 0.0096
<i>Podospora</i>	0.0002	<i>Sordaria</i> 0.0091
<i>Blastocystis</i>	0.0002	<i>Nectria</i> 0.0074
–		<i>Glomerella</i> 0.0062

\*Differences statistically significant between LBE and PDE samples ( $p > 0,05$ ) by STAMP.

### Supplementary Table 3

Table S3. Evaluation of petroleum hydrocarbons degradation potential by microbial consortia using Triphenyl Tetrazolium Chloride redox indicator.

Microbial Consortia	Time					
	48h	72h	96h	120h	144h	168h
CN	-	-	-	-	-	-
LBE	+	++++	++++	+++	++++	++++
PDE	+	+++	+++	+++	+++	++

CN: negative control.

(+) Indicates the start of reduction of the redox indicator in MM1.

#### Supplementary Table 4

Table S4. Evaluation of biosurfactants production by microbial metagenomes.

	Metagenomic Consortia	
	LBE	PDE
Hemolytic activity	+	-
Drop collapse	+	-
Oil spreading (mm)	25.6 ± 3.0	7.0 ± 3.6
Emulsification index (%)	68 ± 1.5	72 ± 2.0

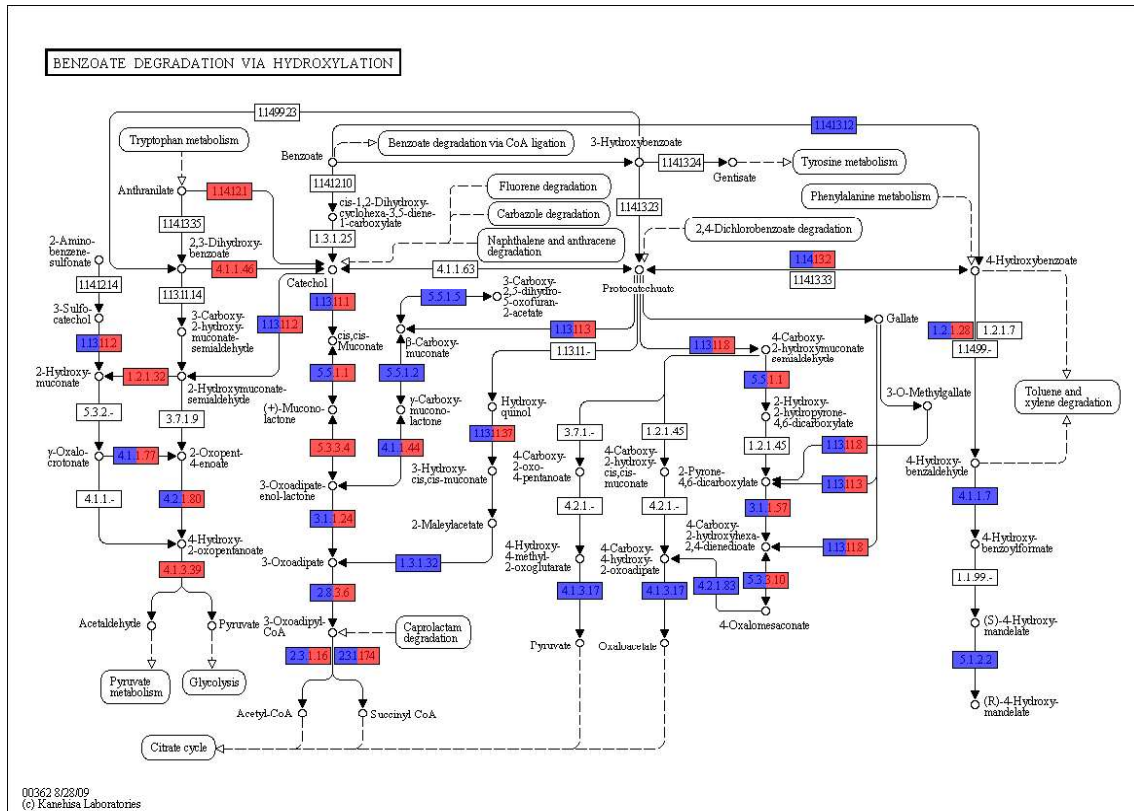
(+) Indicates positive reaction.

## Supplementary Table 5

Table S5. Enzymes discovered in microbial enrichments related to biosurfactants production.

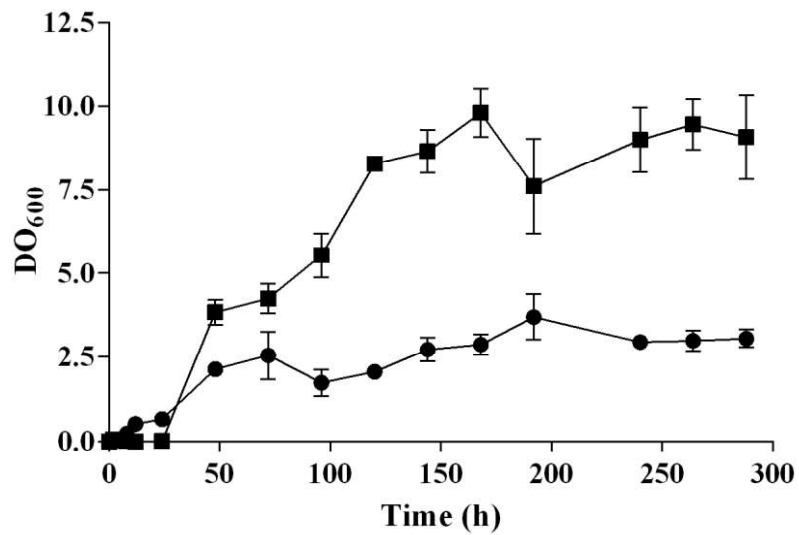
Enzymes	LBE (reads)	PDE (reads)
Alnumycin	1632	947
Amphisin synthetase	9	12
Arthrofactin synthetase	317	131
Bacillomycin synthetase	509	117
Iturin synthetase	1320	286
Lichenysin synthetase	696	205
Malto-oligosyltrehalose synthase	331	669
Phosphatidylethanolamine methyltransferase	156	50
Plipastatin synthetase	530	174
Polyketide synthase	6	3
Putisolvin synthetase	3803	1142
Rhamnosyltransferase	42	30
Serrawettin synthetase	40	22
Surfactin synthetase	587	187
Trehalose-6-phosphate synthase	174	142
Total	10152	4117

## Supplementary Figure 1



**Fig. S1.** Partial KEEG pathway identified for benzoate metabolism from the LBE and PDE metagenomes. The red boxes indicate the enzymes identified in the sequence data of the LBE metagenome, while the blue boxes indicate the enzymes identified in the sequence data of the PDE metagenomes. The empty boxes indicate undetected enzymes.

## Supplementary Figure 2



**Fig. S2.** Cell growth of the enriched oil-drilling samples during 12 days of incubation at 30 °C with crude oil 1% (m/v) in LB and PD medium for LBE (filled circles) and PDE (filled squares), respectively. Error bars represent standard deviation (n = 3).

### **3.2 Capítulo II: Seleção e caracterização de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo**

Este capítulo apresenta os resultados obtidos durante o período de estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior, na Universidade de Barcelona (UB), sob a supervisão da Professora Magdalena Ruiz Grifoll.

No Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram realizados os cultivos microbianos para o isolamento de microrganismos com capacidades degradativas de hidrocarbonetos, com o auxílio do aluno de iniciação científica René Gabriel, sob a supervisão da Professora Marilene Henning Vainstein.

No Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona, foi realizada a seleção dos microrganismos e as análises de degradação de hidrocarbonetos, com o auxílio da aluna de doutorado Sara N. Jiménez-Volkerink, sob a supervisão da Professora Magdalena Ruiz Grifoll.



### 3.2.1 INTRODUÇÃO

Diversos compostos presentes no petróleo podem servir como substrato para o desenvolvimento de microrganismos. Alguns microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos são altamente especializados, enquanto outros exibem um metabolismo mais versátil, no qual apresentam plasticidade bioquímica para utilizar tanto hidrocarbonetos saturados como aromáticos fundidos, como os PAHs (BRZESZCZ; KASZYCKI, 2018; S. OLIVEIRA et al., 2017; WU et al., 2013).

Desta forma, microrganismos capazes de transformar mais de uma classe de hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no ambiente e a sua presença depende de alguns fatores como: a heterogeneidade da contaminação do petróleo, a qual é diretamente relacionada à presença de *n*-alcanos e PAHs em muitos tipos de petróleo; a maior concentração de *n*-alcanos comparada a outros constituintes da maioria dos contaminantes de petróleo; a maior biodisponibilidade de PAHs dentro do ambiente contaminado, à medida que esses compostos são disponibilizados em outros componentes do petróleo e finalmente, a ocorrência natural de vários compostos apolares em ambientes não poluídos (BALACHANDRAN et al., 2012; BRZESZCZ; KASZYCKI, 2018; FATHEPURE, 2014; GHOSAL et al., 2016). Portanto, as propriedades multi-degradativas podem facilitar a colonização microbiana de ambientes contaminados, bem como de ambientes intactos, tendo um efeito benéfico na adaptação microbiana.

As bactérias são consideradas os agentes predominantemente encontrados na degradação de hidrocarbonetos do petróleo (DAS; CHANDRAN, 2011a; KOSTKA et al., 2011; LEAHY; COLWELL, 1990; SANTISI et al., 2015). Desta forma, a bioaugmentação em ambientes contaminados com diversos compostos tem sido amplamente utilizada no

tratamento de águas e solos poluídos (CERQUEIRA et al., 2012; DAS; CHANDRAN, 2011a; DAS; KAZY, 2014; EL FANTROUSSI; AGATHOS, 2005; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

Essa estratégia tem como objetivo auxiliar na capacidade degradativa de uma matriz contaminada, através da introdução de microrganismos específicos com capacidade de degradar o contaminante alvo, resultando em um aumento da taxa de biodegradação. E, pode ser utilizada de diferentes formas: (i) através do inóculo de uma cultura microbiana pura, (ii) adição de um consórcio microbiano pré-adaptado, (iii) introdução de microrganismos geneticamente modificados, e (iv) por adição de genes relacionados à biodegradação em um plasmídeo transferido para os microrganismos endógenos. A seleção dos microrganismos deve ser baseada no seu potencial metabólico e na capacidade das células microbianas de resistirem a ambientes de estresse elevado. Esta estratégia de remediação tem estimulado as pesquisas em busca de microrganismos capazes de degradar poluentes (BRZESZCZ; KASZYCKI, 2018).

Uma ampla variedade de microrganismos foi identificada com a capacidade de metabolizar o carbono contido nos produtos e resíduos petroquímicos como sua única fonte de energia (CERQUEIRA et al., 2012; DAS; CHANDRAN, 2011a; DAS; KAZY, 2014). Guerra e colaboradores (2018) descreveram o isolamento de diferentes microrganismos, como espécies de *Brevibacillus*, *Micrococcus* e *Bacillus* a partir de enriquecimentos em diferentes meios de cultivo (LB e YPD) a partir de um resíduo de perfuração de poço de petróleo proveniente da mesma região do resíduo utilizado neste trabalho (Rio Grande do Norte, Brasil).

Muitos estudos envolvem Archaeas (*Archaeoglobus*) e bactérias redutoras de sulfato (*Deltaproteobacteria*, *Firmicutes* e *Thermodesulfobacterium*), Archaeas

(*Thermococcus*, *Pyrococcus*) e bactérias fermentativas (*Firmicutes*, *Thermotogae*, *Synergistetes*, *Spirochaetes*), microrganismos redutores de ferro (*Gamaproteobactérias*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Thermotogae*, *Thermococcus*), microrganismos redutores de nitrato (*Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*), homoacetogênicos (*Firmicutes*) e Archaeas metanogênicas (*Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*) (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). Além disso, o número de microrganismos isolados a partir do campo petrolífero está crescendo continuamente.

Esses microrganismos podem desempenhar um papel importante na remoção de contaminações heterogêneas, e são assim considerados uma solução promissora na aplicação da biorremediação. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi isolar e caracterizar microrganismos que apresentassem capacidade de degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.

## **3.2.2 METODOLOGIA**

### **3.2.2.1 Obtenção das Amostras**

Para a realização dos ensaios de bioprospecção microbiana, amostras de um resíduo de perfuração de poços de petróleo da Bacia Potiguar foram obtidas do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. As amostras foram coletadas pela empresa *Brasil Química e Mineração Industrial Ltda.*, durante as fases de perfuração dos poços, armazenadas em embalagens plásticas e transportadas para o laboratório.

A água marinha utilizada no estudo foi coletada na plataforma da Praia de Salinas no município de Cidreira, Rio Grande do Sul, Brasil (30°08'59.4"S 50°11'15.4"W). Estas foram armazenadas em embalagens plásticas e transportadas para o laboratório.

A amostra de petróleo Casa Blanca é proveniente da Bacia de Tarragona, e foi gentilmente fornecida pelo Professor Joan O. Grimalt do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), Barcelona, Espanha.

### **3.2.2.2 Isolamento de microrganismos**

Para obter microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos, foram realizados ensaios de bioprospecção em diferentes meios de cultura e tempos de incubação. Para isto, o isolamento dos microrganismos foi realizado em três etapas. Na primeira, 8 g do resíduo de perfuração de poço de petróleo foram utilizadas como inóculo para as culturas microbianas em 50 mL de (i) meio Luria-Bertani (LB), (ii) Potato Dextrose (PD) (NAPP et al., 2018b) ou (iii) Yeast Peptone Dextrose (YPD) (10 g/L de extrato de

levedura; 20 g/L de peptona; 20 g/L de glicose) suplementado com 1% de petróleo bruto (sem nenhum processo de esterilização) (m/v). Como uma estratégia para aumentar a pressão seletiva, a cada 7 dias, 10% do cultivo foram transferidos para meios frescos. Na segunda etapa, alíquotas de 10% de cada um dos três primeiros enriquecimentos (LB, PD e YPD) foram transferidas para 50 mL de meio mineral Bushnell-Haas (BH) (0,2 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 0,02 g/L de CaCl<sub>2</sub>; 1,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0 g/L de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 0,05 g/L de FeCl<sub>3</sub>), suplementado com 1% de petróleo bruto (m/v). Estes cultivos foram mantidos sob agitação (200 rpm) por mais 21 dias a 30°C, e transferidos para meios frescos a cada 7 dias. Na terceira etapa, 8 g do resíduo de perfuração de poço de petróleo foi utilizada como inóculo para as culturas microbianas diretamente em 50 mL de meio BH ou água do mar, igualmente suplementado com 1% de petróleo bruto (m/v). Os cultivos foram incubados sob agitação (200 rpm) por 90 dias a 30°C, e transferidos para novos meios a cada 30 dias. Ao final do período de incubação de todos os cultivos microbianos, alíquotas de 100 µL foram coletadas e submetidas a diluições decimais sucessivas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) em solução de NaCl 0,85% estéril. Após, 50 µL das diluições foram semeadas por espalhamento nos meios de cultura LB, PD, YPD e/ou BH, adicionados de ágar (2%) e incubados em estufa a 30°C por 7 dias. Os morfotipos dos microrganismos que se desenvolveram em tais condições foram transferidos pela técnica de esgotamento para novos meios sólidos, a fim de obter colônias puras dos microrganismos. Os isolados foram armazenados em glicerol (20%) a -80 °C.

Além disso, também foram utilizados microrganismos provenientes da Coleção de Biodegradação do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (LabFIMB), do Centro de Biotecnologia, UFRGS.

### **3.2.2.3 Seleção de microrganismos com capacidade de utilização de hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono**

Para selecionar os microrganismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos, após o isolamento foi realizado um experimento em ágar BH suplementado com concentrações crescentes (0,03 g/L a 20 g/L) de uma mistura contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): fenantreno p.a., antraceno p.a. e pireno p.a. (Sigma-Aldrich) conforme descrito por KIYOHARA e colaboradores (1982). Os meios foram incubados a 30°C. Este procedimento foi utilizado para avaliar o crescimento microbiano durante a metabolização de hidrocarboneto como única fonte de carbono (KIYOHARA et al., 1982). Posteriormente, os microrganismos selecionados a partir deste teste foram caracterizados morfológicamente por coloração de Gram (MCCLELLAND, 2001).

### **3.2.2.4 Avaliação da biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)**

Para avaliar a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos, pelos microrganismos, previamente selecionados, foram submetidos a ensaios de biorremediação.

#### 3.2.2.4.1 Biodegradação de creosota e hexadecano

A creosota é um composto viscoso líquido ou semissólido de consistência oleosa, formada por uma complexa mistura de PAHs (85%), hetero-PAHs (N-, S- e O-) (5%) e compostos fenólicos (10%) (MUELLER; CHAPMAN; PRITCHARD, 1989). Desta forma, 2,5 g de creosota comercial (West Chester, PA) foram purificadas por coluna cromatográfica conforme descrito por Grifoll e colaboradores (1995) e utilizadas para obtenção de uma solução de PAHs. Para analisar a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos foi utilizado o composto hexadecano p.a. (Merck).

Inicialmente, todos os microrganismos selecionados foram previamente cultivados em meio líquido (50 mL) rico em nutrientes, e incubados sob agitação (200 rpm) em temperatura de 30 °C. As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 24 h, as leveduras foram cultivadas em meio YPD durante 48 h e os fungos filamentosos foram cultivados em meio PD durante 5 dias. Após o período de pré-inóculo, as células microbianas foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,85% estéril. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma suspensão de células ( $OD_{600nm}$  0.7) como inóculo para os experimentos de degradação em meio líquido BH (20 mL), suplementado com a mistura de PAHs (5 g/L) e hexadecano (5 g/L). Como controle negativo, foi utilizado o meio BH suplementado com PAHs e hexadecano na ausência de células microbianas. Os cultivos foram realizados em triplicata. Análises por cromatografia gasosa foram empregadas para investigar a degradação de PAHs e hexadecano pelos microrganismos. Estas análises foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso com Detector por Ionização de Chamas (GC-FID) TRACE GC2000 (Thermo Fisher Scientific) como descrito por Lopez e

colaboradores (2008). Após 21 dias de incubação a 30 °C, os microrganismos com maior atividade de degradação dos hidrocarbonetos foram selecionados.

#### **3.2.2.4.2 Biodegradação de fenantreno e hexadecano**

Para avaliar especificamente a biodegradação de fenantreno e hexadecano, os microrganismos selecionados foram submetidos às mesmas condições e análises descritas no item 3.2.2.4.1. Após 21 dias de incubação a 30°C em meio líquido BH (20 mL) suplementado com fenantreno (5 g/L) e hexadecano (5 g/L), os microrganismos com maior atividade de degradação foram selecionados.

#### **3.2.2.4.3 Biodegradação de petróleo bruto**

Para avaliar a biodegradação de hidrocarbonetos presentes em petróleo bruto, os microrganismos selecionados foram submetidos às mesmas condições de cultivo previamente descritas no item 3.2.2.4.1. Após 45 dias de incubação a 30°C em meio líquido BH (30 mL) suplementado com petróleo CasaBlanca (5 g/L), análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) foram empregadas para investigar a degradação dos hidrocarbonetos. Estas análises foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso *Hewlett Packard HP5890 series II* acoplado a um Espectrometro de Massas HP5989 como descrito por Vila e Grifoll (2009).



### **3.2.2.5 Produção de biossurfactantes**

Para a avaliação da produção de biossurfactantes pelo microrganismo selecionado nos testes anteriores, foram realizadas quatro análises: (i) índice de emulsificação, (ii) colapso da gota, (iii) espalhamento do óleo e (iv) medida de tensão superficial. O isolado foi previamente inoculado em meio LB líquido e incubado por 24 h sob agitação (200 rpm) a 30°C. Após o período de pré-inóculo, as células microbianas foram centrifugadas por 10 min a 9000 rpm. As células recuperadas foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,85% estéril. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma suspensão de células ( $OD_{600nm}$  0.7) como inóculo para os experimentos de produção de biossurfactantes em meio líquido BH (20 mL), suplementado com petróleo bruto (5 g/L). Foram realizados testes nos tempos 0, 7 e 15 dias. Todos os experimentos foram realizados triplicatas.

#### **3.2.2.5.1 Índice de emulsificação**

A medida do percentual do índice de emulsificação em 24 h ( $IE_{24h}\%$ ) foi realizada de acordo com Cooper e Goldenberg (1987), para verificar a formação de emulsões pelos biossurfactantes de alto peso molecular produzidos pelo microrganismo selecionado. O índice de emulsificação foi determinado através da adição de 2 mL do meio de cultura, misturados a 2 mL de querosene em tubos de ensaio com fundo chato, com agitação por 2 min. Os tubos foram incubados de forma estática por 24 h à temperatura ambiente. Após esse período, o  $IE_{24h}\%$  foi calculado através da Equação 01. Para este teste foram realizadas triplicatas biológicas.

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

[01]

A verificação do índice de emulsificação foi realizada em amostras de sobrenadante (células removidas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min) e em amostras com presença de células microbianas.

### **3.2.2.5.2 Colapso da Gota**

O teste de colapso da gota foi realizado de acordo com o método descrito por Jain e colaboradores (1991) e modificado por Bodour e Miller-Maier (1998). Os testes foram realizados em uma superfície plana contendo 1,8  $\mu\text{L}$  de óleo lubrificante (SINGER<sup>TM</sup>), na qual 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante microbiano foram adicionados. A forma da gotícula foi observada durante 1 min. O ensaio foi classificado como negativo se a gota permaneceu frisada, e positivo se a gota colapsou. Como controle negativo foi utilizada água destilada (20  $\mu\text{L}$ ) e como controle positivo foi utilizado SDS 10% (20  $\mu\text{L}$ ).

### **3.2.2.5.3 Espalhamento do óleo**

Este experimento foi realizado de acordo com Pornsunthorntawee e colaboradores (2008). Primeiramente, 30 mL de água destilada foram adicionados em uma placa de Petri (15 cm de diâmetro), em seguida 200  $\mu\text{L}$  de petróleo foram dispensados à superfície da água para formar uma fina camada de óleo. Posteriormente, 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante obtido do cultivo microbiano foram cuidadosamente adicionados ao centro da camada de óleo, na qual o diâmetro da zona de limpeza do petróleo foi medido. No caso da presença de

biossurfactantes, o óleo é deslocado, resultando em uma zona de limpeza livre de óleo, tal diâmetro de limpeza é correlacionado com a atividade do surfactante. Como controle negativo foi utilizada água destilada (20  $\mu$ L) e como controle positivo foi utilizado SDS 10% (20  $\mu$ L).

#### **3.2.2.5.4 Tensão superficial**

As análises para determinar as medidas de 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. As análises de TS foram feitas com aproximadamente 10 mL de sobrenadante (células removidas por centrifugação a 9000 rpm por 10 min). Como controle negativo foi utilizado 10 mL de meio de cultura BH suplementado com petróleo (5 g/L).

#### **3.2.2.6 Identificação molecular**

Para o procedimento de extração de DNA o microrganismo selecionado nos testes anteriores foi cultivado em 50 mL de meio LB líquido, incubado *overnight* sob agitação (200 rpm) a 30°C. O cultivo foi centrifugado por 10 min a 9000 rpm. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e as células ressuspensas em 100  $\mu$ L de água ultra-pura livre de nucleases (Sigma-Aldrich) e 30  $\mu$ L de Chelex 20% em TE 1X (0,15 M de NaCl, 10mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8,2% de SDS) foram adicionados para a lise enzimática das células microbianas. Esta mistura foi agitada vigorosamente por 1 min e incubada por 25 min a 95°C. As amostras foram centrifugadas à 9000 rpm por 5 min e o

sobrenadante foi recuperado. A verificação da integridade do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e as amostras foram armazenadas a -20°C.

O fragmento correspondente à região 16S do DNA ribossomal foi amplificado por PCR com os iniciadores F27 (5' *AGAGTTTGATCCTGGCTCAG* 3') e R1492(5' *TACGGCTACCTTGTTACGAC* 3'). A reação de PCR foi realizada de acordo com o protocolo *PuReTaq<sup>TM</sup>Ready-To-Go<sup>TM</sup> PCR Beads Kit<sup>®</sup>* (GE Healthcare), 23,5 µL de água ultra-pura livre de nucleases (Sigma-Aldrich), 0,25µL de cada primer (F27 e R1492; 100 µM) e 1 µL (50 ng) de DNA genômico. O volume final da reação foi de 25 µL. O programa para amplificação utilizado possuiu as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido de 30 ciclos (95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 2 min) e 72°C de extensão final por 10 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados utilizando o kit *ExoSAP-IT<sup>TM</sup> PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 100 ng de DNA genômico foram utilizados para a reação de sequenciamento na plataforma ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) com o *Big Dye terminator cycle sequencing Kit V. 2.0* (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no Centro Tecnológico e Científico da Universidade de Barcelona (UB), Espanha. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas, utilizando o programa *BioEdit* (HALL, 1999) e comparadas com as sequências de nucleotídeos de espécies de referência obtidas EMBL/GenBank database, utilizando a plataforma NCBI BLAST e Ribosomal Database Project II (WANG et al., 2007).

### **3.2.2.7 Análise filogenética**

Primeiramente, as sequências de rDNA 16S com no mínimo de 1400 pb do gênero *Rhodococcus* foram obtidas do banco de dados RNA ribossomal online Silva (QUAST et al., 2013) e alinhadas pelo programa CLUSTAL Omega (SIEVERS et al., 2011). Três árvores filogenéticas foram geradas por meio do programa MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), utilizando os métodos estatísticos Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood e Maximum Parsimony, com o valor de bootstrap de 1000.

## **3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.2.3.1 Obtenção de microrganismos a partir de resíduo de perfuração de poço de petróleo e seleção preliminar de microrganismos com capacidade de utilizar hidrocarbonetos**

Com o objetivo de obter microrganismos tolerantes a presença de petróleo e com possível habilidade de degradação de hidrocarbonetos, foram realizados isolamentos utilizando a técnica de enriquecimento seletivo em diferentes meios de cultura. A amostra ambiental utilizada para selecionar os microrganismos foi obtida de resíduo de perfuração de poços de petróleo, e esta foi previamente caracterizada (NAPP et al., 2018). A análise da composição química do resíduo revelou a presença de 108,9 g/kg de hidrocarbonetos, esta concentração é considerada elevada para amostras ambientais (AL-ANSARY; AL-TABBAA, 2007). Entre os compostos presentes no resíduo os hidrocarbonetos alifáticos foram encontrados como mais prevalentes (93,76%).

Além disso, para aumentar a pressão seletiva nos meios, 1% de petróleo bruto foi adicionado na bioprospecção. De acordo com diversos autores, microrganismos são capazes de se desenvolver em ambientes contaminados com diversos poluentes, incluindo os resíduos da indústria petroquímica (ATLAS, 1981; CERQUEIRA et al., 2012; DÖRR DE QUADROS et al., 2016; MIRETE; MORGANTE; GONZÁLEZ-PASTOR, 2016; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003b). Em alguns casos, estes microrganismos adquirem a habilidade de metabolizar a fonte de carbono provenientes dos poluentes, e desenvolvem todo o aparato enzimático necessário para a degradação dos compostos (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011; PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011; PEIXOTO et al., 2011).

Neste contexto, os diferentes morfotipos cultiváveis em meio sólido foram selecionados e isolados neste trabalho.

A seleção inicial foi realizada utilizando enriquecimentos em três meios de cultivo ricos em nutrientes (LB, PD e YPD), a qual possibilitou ao final de 21 dias de incubação isolar 14 microrganismos a partir do meio LB, 7 microrganismos a partir do meio PD e 9 microrganismos a partir do meio YPD, totalizando 30 microrganismos.

Na segunda etapa de isolamento, 10% do crescimento microbiano de cada um dos meios anteriores foi utilizado como inóculo para meios BH. Após 21 dias de incubação, foi possível isolar 10 microrganismos a partir do meio BH contendo inóculo proveniente do meio LB, 3 microrganismos do inóculo com PD e 2 microrganismos do inóculo com YPD, totalizando 15 isolados.

Neste trabalho, também foi realizada uma terceira etapa de isolamento, aumentando o tempo de incubação para 90 dias em dois meios de cultivo diferentes (BH e água marinha), visando aumentar a pressão seletiva e a adaptação da comunidade microbiana

existente no resíduo utilizado. Esta etapa permitiu isolar 38 microrganismos do cultivo em BH e 26 microrganismos do cultivo diretamente em água do mar, totalizando 64 microrganismos isolados.

Além disso, outros seis microrganismos provenientes da Coleção de biodegradação do LabFIMB foram selecionados. No total, 115 microrganismos foram utilizados para os testes de seleção preliminar de utilização de hidrocarbonetos.

Para selecionar os microrganismos com a melhor atividade metabólica para degradação de hidrocarbonetos aromáticos, foram realizados testes prévios em agar BH contendo diferentes concentrações de PAHs (fenantreno, antraceno e pireno) (KIYOHARA et al., 1982). Na primeira etapa de seleção, todos os 115 microrganismos foram semeados em agar BH com 0,03% de PAHs. Apenas para 4 microrganismos não foi possível observar crescimento e formação de colônias. Devido a isto, foram utilizadas concentrações crescentes da solução de hidrocarbonetos. Primeiramente, o crescimento microbiano foi observado em agar BH com 0.05% de PAHs. Nestas condições, 50 microrganismos dos 111 remanescentes foram selecionados. Após isto, testes contendo 1 e 2% de PAHs foram realizados e 26 microrganismos foram selecionados, em ambos os testes, conforme podemos observar nas Tabelas 4, 5 e 6.

**Tabela 4. Microrganismos isolados de resíduo de perfuração de poços de petróleo.**

<b>Isolado</b>	<b>Condição de Isolamento</b>	<b>Morfologia Celular</b>	<b>*BH + PAHs</b>
CPD 1	Microrganismos isolados a	Bacilo gram positivo	++
CPD 3	partir de resíduo de	Fungo filamentoso	++
CPD 8	perfuração de poço de	Fungo leveduriforme	++
CPD 9.2	petróleo enriquecido com meio PD por 21 dias	Bacilo gram positivo	++
CYP 2	Microrganismos isolados a partir de resíduo de perfuração de poço de petróleo enriquecido com meio YPD por 21 dias	Bacilo gram negativo	++
CLB 5	Microrganismos isolados a	Cocos gram negativo	++
CLB 10.3	partir de resíduo de	Bacilo gram positivo	++
CLB 11	perfuração de poço de petróleo enriquecido com meio LB por 21 dias	Cocos gram positivo	++
BHCLB 3	Microrganismos isolados a partir de resíduo de perfuração de poço de petróleo enriquecido com meio LB por 21 dias e transferidos para meio BH cultivado por mais 21 dias	Bacilo gram positivo	++

\* BH + PAHs = agar BH com 2% de solução de fenantreno, antraceno e pireno.

++ indica desenvolvimento microbiano em agar BH + PAHs.

**Tabela 5. Microrganismos isolados de resíduo de perfuração de poços de petróleo.**

<b>Isolado</b>	<b>Condição de Isolamento</b>	<b>Morfologia Celular</b>	<b>*BH + PAHs</b>
CRN BL5	Microrganismos isolados a	Bacilo gram negativo	++
CRN BL6	partir de resíduo de perfuração	Bacilo gram negativo	++
CRN BL7	de poço de petróleo cultivado	Cocos gram negativo	++
CRN BL8	em meio BH por 90 dias	Cocos gram positivo	++
CRN B1		Bacilo gram negativo	++
CRN MB1	Microrganismos isolados a	Fungo leveduriforme	++
CRN ML3	partir de resíduo de perfuração	Bacilo gram negativo	++
CRN ML5	de poço de petróleo cultivado	Bacilo gram negativo	++
CRN ML6	em água marinha por 90 dias	Bacilo gram negativo	++
CRN MY2		Fungo leveduriforme	++
CRN MY4		Cocos gram negativo	++

\* BH + PAHs = agar BH com 2% de solução de fenantreno, antraceno e pireno.

++ indica desenvolvimento microbiano em agar BH + PAHs.



**Tabela 6. Microrganismos da Coleção de Biodegradação do Laboratório de Fungos de Importância.**

Isolado	Condição de Isolamento	Morfologia Celular	*BH + PAHs
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Moro et al., 2018	Bacilo gram negativo	++
<i>Bacillus cereus</i>	Dörr et al., 2016	Bacilo gram negativo	++
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Pereira et al, 2018**	Bacilo gram negativo	++
<i>Pseudomonas sihuiensis</i>	Pereira et al, 2018**	Bacilo gram negativo	++
<i>Brevibacterium sanguinis</i>	Pereira et al, 2018**	Bacilo gram negativo	++
<i>Acylobacter polymorphus</i>	Pereira et al, 2018**	Cocos gram positivo	++

\* BH + PAHs = agar BH com 2% de solução de fenantreno, antraceno e pireno.

\*\*Dados não publicados.

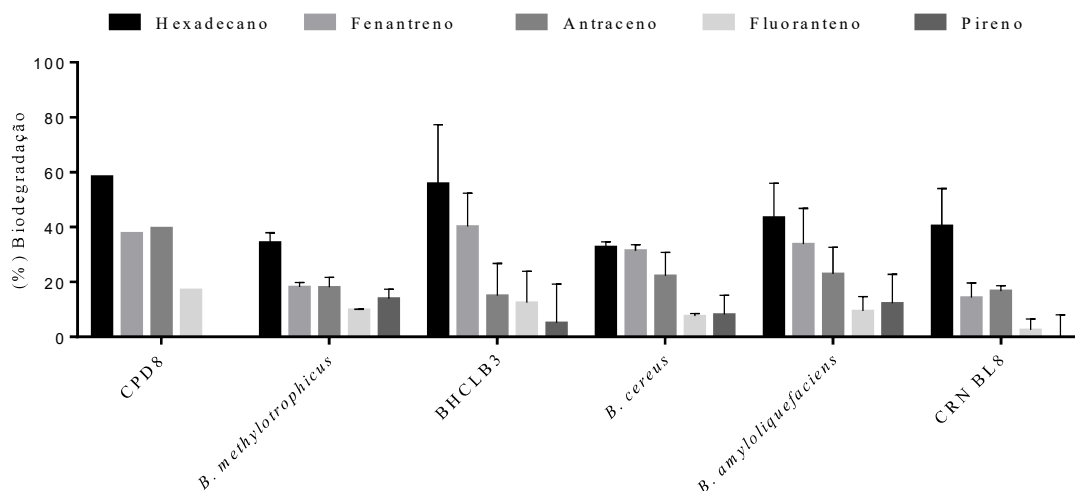
++ indica desenvolvimento microbiano em agar BH + PAHs.

Todos os 26 microrganismos selecionados para os testes posteriores foram caracterizados morfologicamente. Entre eles 22 foram caracterizados como bactérias, 3 como fungos leveduriformes e 1 fungo dimórfico (Tabelas 4, 5 e 6).

### **3.2.3.2 Avaliação da biodegradação de hexadecano e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) presentes na creosota**

Para avaliar a capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos previamente selecionados, estes foram submetidos a ensaios de degradação em meios BH contendo hexadecano e PAHs provenientes da creosota. Hexadecano por ser um *n*-alcano com 16 carbonos em sua cadeia foi utilizado para avaliar a degradação de hidrocarbonetos alifáticos. A creosota, por sua vez, é um produto derivado do carvão, e na sua composição alguns PAHs como fenantreno, fluoranteno e pireno estão presentes em grandes quantidades (NYLUND et al., 1992).

Assim, ao final de 21 dias de degradação destes compostos, os microrganismos com aumento na atividade de degradação foram selecionados, conforme pode ser observado na Figura 8. Os isolados CPD8, *Bacillus methylotrophicus*, BHCLB3, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e CRN BL8 apresentaram os melhores resultados.

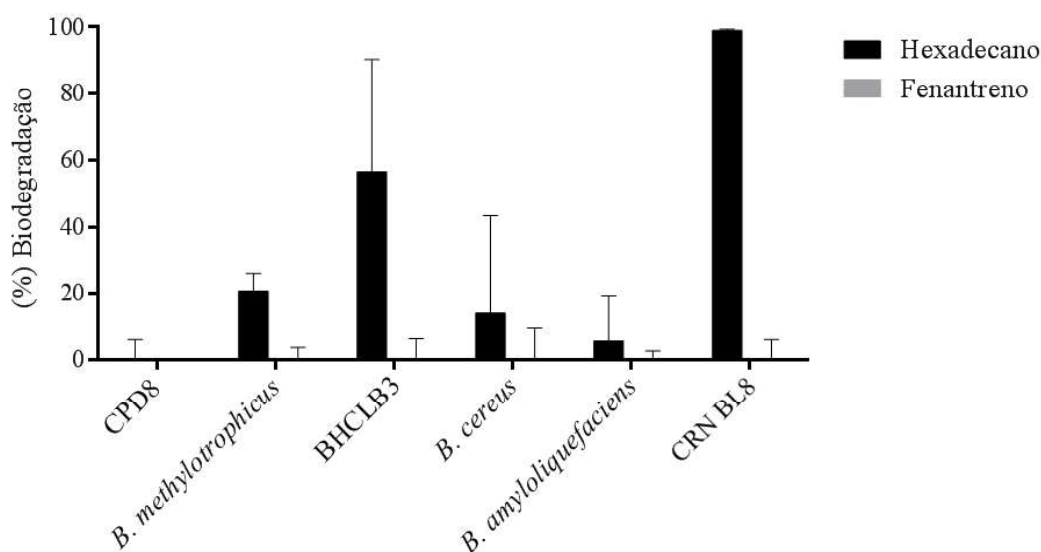


**Figura 8. Biodegradação de hexadecano e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na creosota.** Porcentagem de degradação de hexadecano (5 g/L) e PAHs (5 g/L) após 21 dias de remediação em meio líquido BH a 30 °C e 200 rpm. Dados referentes às médias ( $\pm$  SD) das triplicatas. Experimento normalizado com Benzo[b]fluoranteno.

Como podemos observar na Figura 8 os compostos hexadecano e fenantreno foram os hidrocarbonetos mais metabolizados durante o processo de remediação pelos isolados.

### 3.2.3.3 Avaliação da biodegradação de hexadecano e fenantreno

Em decorrência dos resultados encontrados no primeiro experimento de remediação, os seis microrganismos selecionados foram submetidos a um teste para avaliar a biodegradação de fenantreno e hexadecano especificamente. Após 21 dias de incubação a 30 °C em meio líquido BH suplementado com fenantreno (5 g/L) e hexadecano (5 g/L), a atividade de degradação dos microrganismos foi observada (Figura 9).



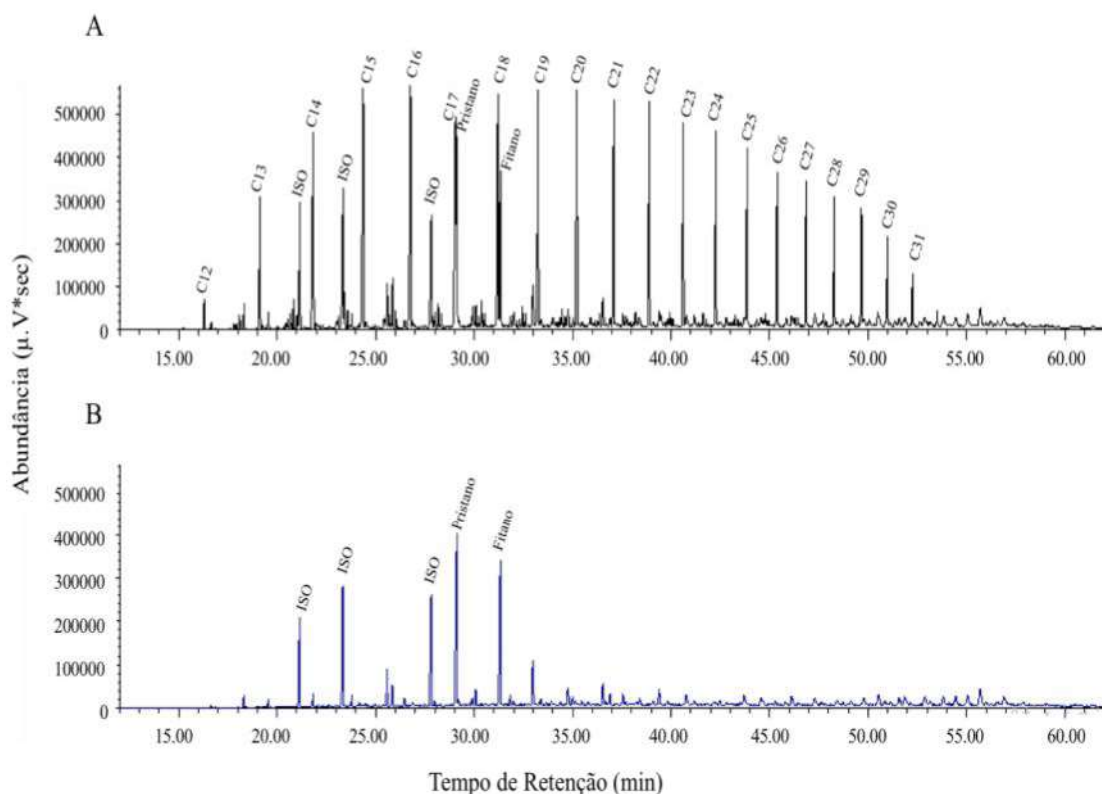
**Figura 9. Biodegradação de hexadecano e fenantreno.** Porcentagem de degradação de hexadecano (5 g/L) e fenantreno (5 g/L) após 21 dias de remediação em meio líquido BH a 30 °C e 200 rpm. Dados referentes às médias ( $\pm$  SD) das triplicatas.

Dois isolados, BHCLB3 e CRN BL8, degradaram eficientemente o hexadecano (Figura 9). Porém, CRN BL8 apresentou aumento nos resultados para degradação desse composto (98,7%). No entanto, nenhuma degradação de fenantreno foi observada pelos microrganismos. Isso pode ser explicado pela hipótese de que esses microrganismos apenas degradam hidrocarbonetos aromáticos metilados, os quais estão presentes em amostras de petróleo bruto e seus derivados, como parte dos PAHs encontrados na creosota (GRIFOLL et al., 1995).

### 3.2.3.4 Avaliação da biodegradação de petróleo bruto

Para testar esta hipótese, os dois isolados, BHCLB3 e CRN BL8, foram utilizados para analisar a biodegradação de hidrocarbonetos presentes em petróleo bruto em meio líquido BH suplementado com petróleo CasaBlanca (5 g/L). Devido ao fato, de o petróleo ser composto por uma complexa mistura de hidrocarbonetos, o tempo de incubação foi

aumentado para 45 dias a 30 °C. Ao final do experimento o isolado BHCLB3 não apresentou resultados positivos. Entretanto, o microrganismo CRN BL8 apresentou desempenho satisfatório para degradação das principais frações de hidrocarbonetos presentes no petróleo utilizado (Figura 10).



**Figura 10. Cromatograma da fração de hidrocarbonetos alifáticos presentes no petróleo CasaBlanca.** Porcentagem de biodegradação de petróleo bruto (5 g/L) após 45 dias de incubação em meio liquid BH a 30 °C e 200 rpm. (A) Controle negativo (abiótico) e (B) Biodegradação com inóculo da CRN BL8. Dados referentes às médias ( $\pm$  SD) das triplicatas. ISO: compostos isoprenóides.

Desta forma, a partir desta análise foi possível observar uma significativa diminuição na mancha de petróleo durante o decorrer do período de incubação no meio contendo o inóculo com a bactéria CRN BL8, corroborando com os resultados obtidos a partir da quantificação dos hidrocarbonetos remanescentes na amostra final.

Este isolado foi capaz de reduzir praticamente toda a fração dos hidrocarbonetos alifáticos presentes no petróleo bruto utilizado, inclusive os hidrocarbonetos de cadeias mais pesadas (C35-C40). No entanto, algumas das frações isoprenóides, como por exemplo: pristano e fitano, não foram completamente degradadas (Figura 10).

Estudos demonstram que as taxas de degradação de *n*-alcanos dependem de vários fatores, um deles é a forma que o substrato está presente na amostra, estando como um composto puro ou numa mistura de compostos. A biodegradabilidade dos alifáticos também é outro fator importante, o qual é influenciado negativamente pela ramificação na cadeia de hidrocarbonetos. Assim, o grau de resistência à biodegradação depende do número de ramificações e das posições dos grupos metila na molécula (MAIER; GENTRY, 2015).

Diversos autores descrevem a capacidade de bactérias de degradar hidrocarbonetos alifáticos (CERQUEIRA et al., 2012; SARKAR et al., 2017; VILA; GRIFOLL, 2009; YANG et al., 2014). Leahy e Colwell (1990) reportaram a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por diversos gêneros bacterianos *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus*.

Em um trabalho realizado por VILA e GRIFOLL (2009), a degradação de hidrocarbonetos presentes no óleo (Prestige) em água marinha foi analisada. Após 60 dias de incubação com a linhagem *Mycobacterium* sp. AP1 ocorreu a completa remoção dos hidrocarbonetos lineares (C12-C40) e ramificados. Sugerindo que um aumento no tempo de incubação em nossos experimentos poderia ocasionar a degradação das frações de isoprenóides restantes.

Em relação à fração aromática presente no petróleo bruto não foi observada diferença significativa na degradação, quando comparada com as amostras controle. Assim, o microrganismo CRN BL8 possivelmente apresenta preferência para metabolizar os hidrocarbonetos alifáticos presentes em maior quantidade na amostra, os quais se encontram mais biodisponíveis para o acesso microbiano. Nossos resultados também corroboram com as condições de isolamento empregadas neste estudo, onde foi utilizado um resíduo de perfuração de poço de petróleo rico em hidrocarbonetos alifáticos, podendo assim ter adaptado a comunidade microbiana isolada (NAPP et al., 2018).

### **3.2.3.5 Avaliação de produção de biossurfactantes por CRN BL8**

A produção de biossurfactantes pelo microrganismo selecionado, foi avaliada na tentativa de elucidar com diferentes experimentos, a utilização dos hidrocarbonetos do petróleo.

Primeiramente, para avaliar a produção de biossurfactantes de alto peso molecular pelo isolado CRN BL8, foi realizado o teste de Índice de Emulsificação (IE<sub>24h</sub>%) (COOPER; GOLDENBERG, 1987). Como uma estratégia de adaptação dos microrganismos à presença de contaminantes hidrofóbicos, bioemulsificantes podem ser produzidos, estes têm a capacidade de aumentar a área de contato entre o substrato hidrofóbico e a célula microbiana (CHRZANOWSKI et al., 2012; ŁAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI, 2013). Nossos resultados, demonstraram que nos primeiros tempos de incubação (1 e 7 dias), o isolado CRN BL8 não foi capaz de produzir emulsificação, porém em 15 dias de cultivo foi encontrado uma capacidade de emulsificação de 34,6 % (Tabela 7), indicando que o microrganismo é capaz de produzir

biossurfactantes de alto peso molecular apenas em tempos avançados de incubação com petróleo.

Os biossurfactantes de baixo peso molecular são as moléculas responsáveis por reduzir a tensão superficial. O método de colapso da gota e o ensaio de dispersão de óleo são métodos qualitativos e de simples avaliação, e foram utilizados juntamente com a medida da tensão superficial no experimento de biodegradação. Os resultados podem ser observados na Tabela 7. Durante as primeiras 24 h do experimento de biodegradação não ocorreu a produção de biossurfactantes de baixo peso molecular. Nos tempos 7 e 15 dias de incubação a medida da tensão superficial das amostras apresentou uma redução de 58 para aproximadamente 40 mN/m quando comparado com a amostra controle (Tabela 7). Nos tempos 7 e 15 dias de incubação foi observado o colapso total da gota de sobrenadante do meio de cultivo, e o espalhamento do óleo em água de 9 mm e 13 mm, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7. Produção de biossurfactantes pelo microrganismo CRN BL8 durante a biodegradação de petróleo.**

	<b>IE<sub>24h</sub> (%)</b>	<b>Colapso da Gota</b>	<b>Espalhamento do óleo (mm)</b>	<b>Tensão Superficial (mN/M)</b>
Controle negativo	-	-	-	58,0± 0,2
Tempo (dias)				
1	-	-	-	62,1 ± 0,6
7	-	++	9 ± 2	33,9 ± 0,4
15	34,6 ± 2	++	13 ± 6	40,3 ± 0,1

(-) resultado negativo.

(+) resultado positivo.

Entre os biossurfactantes de alto peso molecular estão os poliméricos e os particulados que não possuem, necessariamente, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica na mesma molécula, mas podem possuir polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros (CHEN; JUANG; WEI, 2015; DESAI; BANAT,

1997; RON; ROSENBERG, 2002). Desta forma, nossos resultados demonstram que o isolado CRN BL8 pode estar produzindo algum dos tipos de emulsificantes citados acima.

De acordo com Willumsen e Karlson (1996) um biossurfactante eficiente tem a capacidade de reduzir a medida da tensão superficial do meio em até 20 unidades, isto quando comparado à água destilada, o que significa que valores inferiores a 50 mN/m são considerados satisfatórios. Esta reação é ocasionada pela produção de biossurfactantes de baixo peso molecular, os quais incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas e fosfolipídeos ou ácidos graxos (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Um dos métodos mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante é a medida da CMC, que varia na solução aquosa em função da estrutura do tensoativo, temperatura da solução, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos (CHRZANOWSKI et al., 2012; MULLIGAN, 2005).

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; GOLDENBERG, 1987). Em processos onde ocorre a biodegradação de hidrocarbonetos, a redução da tensão superficial é comum, onde os microrganismos são induzidos a produzir agentes tensoativos extracelulares, o que possibilita a formação de microemulsões estáveis, facilitando o transporte e metabolização de hidrocarbonetos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2011; MULLIGAN; MUDHOO; SHARMA, 2014; S. OLIVEIRA et al., 2017).

Em um estudo realizado por Moro e colaboradores (2018), foi avaliado a capacidade de produção de biossurfactantes para 200 microrganismos obtidos a partir de solos contaminados com resíduos petroquímicos. Este trabalho demonstrou que os microrganismos selecionados pelos autores não tinham capacidade de produzir substâncias tensoativas e emulsificantes em meio de cultivo pobre suplementado com hidrocarbonetos

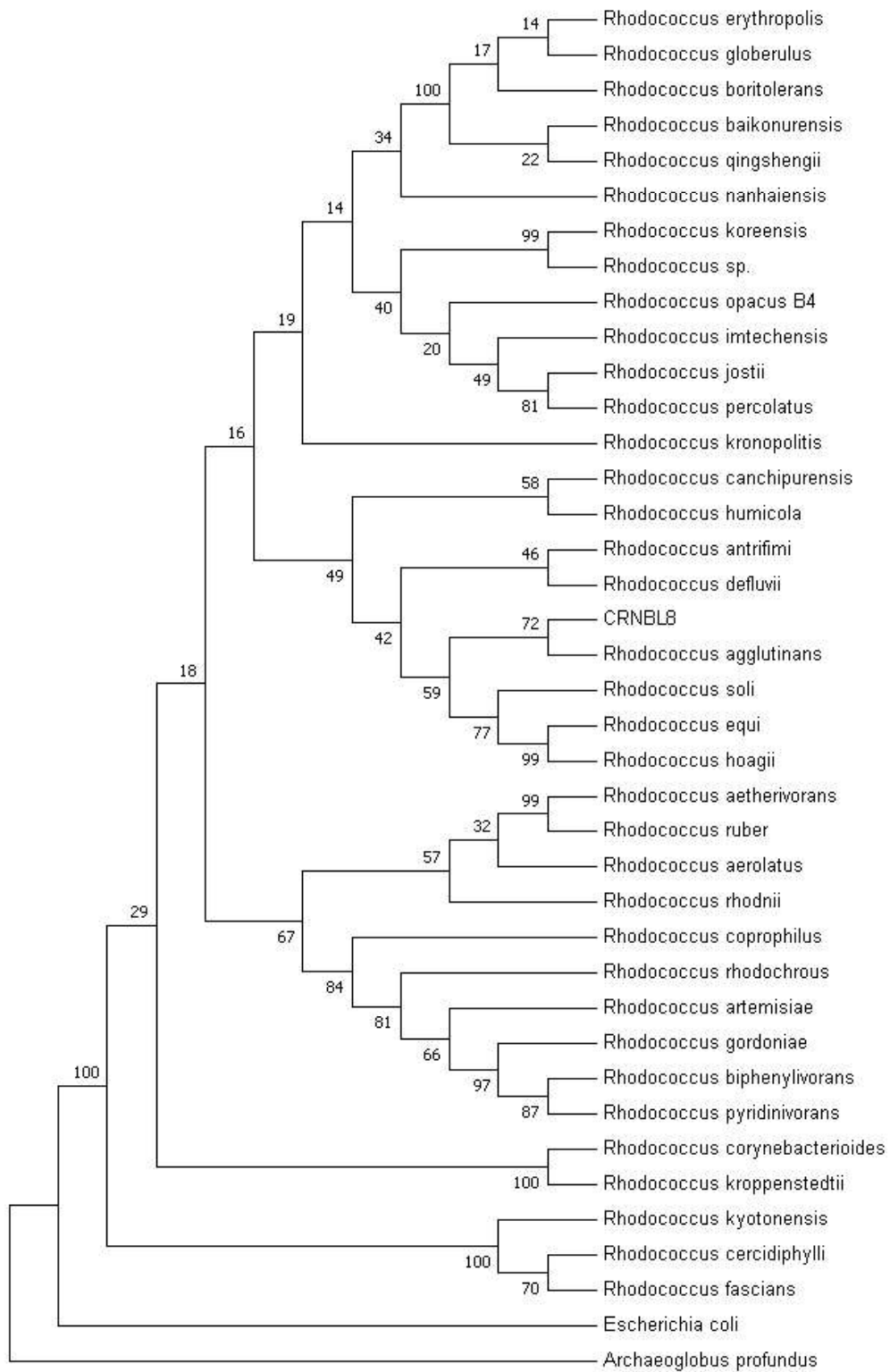


de petróleo, porém quando utilizado um meio de cultivo com glicose (5%) como fonte de carbono, 14 isolados mostraram capacidade de produzir biossurfactantes.

Com base em dados da literatura e nos resultados encontrados em nosso estudo, podemos sugerir que existe uma produção significativa de substâncias tensoativas pelo microrganismo selecionado quando este está em contato com hidrocarbonetos de petróleo como única fonte de carbono.

### **3.2.3.6 Identificação molecular do microrganismo CRN BL8 e análise filogenética**

Ao final de todos os testes previamente descritos, o microrganismo CRN BL8 foi selecionado com o maior potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, este foi identificado por técnicas moleculares. A análise da sequência parcial do gene 16S rDNA mostrou que o isolado bacteriano pertence ao gênero *Rhodococcus*. Desta forma, análises filogenéticas, visando obter uma melhor caracterização do microrganismo também foram realizadas (Figura 11; Apêndice A e B).



**Figura 11. Análise filogenética baseada em sequências 16S gene rDNA do gênero *Rhodococcus*.** Alinhamento utilizando o programa CLUSTAL Omega. Método de *Maximum Likelihood*, com valores de bootstrap (1000).

Conforme a análise filogenética, o isolado bacteriano identificado como *Rhodococcus* sp. (CRN BL8), não possui similaridade com nenhuma das espécies já descritas para esse gênero, sugerindo que o microrganismo isolado neste estudo, possa ser uma espécie NOVA de *Rhodococcus*. É possível observar também, que este se encontra mais próximo filogeneticamente da espécie de *Rhodococcus aglutinans*, apresentando o mesmo ancestral comum, e podendo ser uma espécie derivada de *Rhodococcus aglutinans*.

*Rhodococcus* é um gênero da classe das Actinobatérias (família *Nocardiaceae*) amplamente distribuído na natureza e apresentam notáveis características metabólicas, isto é devido à presença de grandes e móveis plasmídeos, geralmente lineares, que transportam genes que codificam enzimas importantes capazes de degradar uma ampla gama de compostos orgânicos naturais e xenobióticos (FINNERTY, 1992; KIM et al., 2018; M. ALVAREZ, 2010).

O gênero *Rhodococcus* abrange organismos com as seguintes características: Gram positivos, não móveis que contêm ácido micólico em sua parede celular, microrganismos aeróbicos quimio-organotróficos com metabolismo oxidativo e capacidade de utilizar diversos substratos orgânicos como única fonte de carbono. Apresentam um ciclo de vida complexo que varia entre os diferentes membros. Dependendo da linhagem, bastonetes e cocos podem sofrer uma série de mudanças morfológicas, com os cocos em alguns se convertendo em bastonetes e filamentos. Algumas dessas formas se ramificam e podem se desenvolver em filamentos extensivamente ramificados ou hifas. Essas várias formas morfológicas então se fragmentam, revertendo novamente aos cocos e aos bastonetes curtos (FINNERTY, 1998; ALVAREZ, 2010).

Além da capacidade de metabolizar um amplo espectro de compostos químicos, a tolerância celular a substratos tóxicos e solventes, a frequente falta de repressão catabólica,

a produção de biosurfactantes e a persistência ambiental fazem deles excelentes candidatos para a biorremediação e bioconversão (KIM et al., 2018; KUYUKINA et al., 2015; RETAMAL-MORALES et al., 2018).

Bactérias do gênero *Rhodococcus* são comumente encontradas entre as comunidades microbianas degradadoras de petróleo, em função do seu alto potencial de utilização de hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (FINNERTY, 1998; KIM et al., 2018). Diversos trabalhos têm demonstrado o isolamento de bactérias do gênero *Rhodococcus* em amostras contaminadas com hidrocarbonetos e sua potencialidade no tratamento de derrames de óleos (AMOURIC et al., 2010; CHAUDHARY; KIM, 2018; DE CARVALHO, 2012; YANG et al., 2014).

As vias de biodegradação deste gênero geralmente consistem em diversas vias periféricas (superiores) e algumas vias centrais (inferiores). Por exemplo, no caso de hidrocarbonetos aromáticos, uma ampla gama de monoxigenases e dioxigenases nas vias periféricas inicia o ataque oxidativo do anel aromático, produzindo intermediários centrais, como catecol, protocatecoato e gentisato, que são posteriormente degradados por *orto-*, *meta-* ou *3-oxoadipato* para intermediários do ciclo do ácido cítrico (KIM et al., 2018).

*Rhodococcus erythropolis* apresentou habilidade de degradar *n*-alcanos de C6 e C16 e álcoois mesmo sobre condições previamente consideradas extremas para essa bactéria (DE CARVALHO, 2012). Outros autores também demonstraram a capacidade de degradação de *n*-alcanos e bifenil (SEKINE et al., 2006; YAKIMOV et al., 1999), hexadecano e fenol (CAI et al., 2014; MARGESIN; FONTEYNE; REDL, 2005), tolueno e xileno (CHARTRAIN et al., 1998; KIM et al., 2018), por bactérias do gênero *Rhodococcus*.

Os resultados sugerem que o isolado encontrado neste estudo tem grande potencial de ser uma nova espécie do gênero *Rhodococcus*, porém mais análises são necessárias para comprovar essa hipótese, como testes fenotípicos, quimiotaxonômicos e moleculares.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

O início da biodegradação de compostos orgânicos geralmente segue um período de adaptação ou aclimatação dos microrganismos autóctones, na qual a duração depende da estrutura do contaminante. A exposição prévia a um contaminante por repetidas aplicações ou frequentes derramamentos de óleo, conseqüentemente proporciona um ambiente em que as vias de degradação são mantidas dentro de uma comunidade adaptada (MAIER; GENTRY, 2015; MÜLLER, 2009; VANDECASTEELE; JONES, 2008b).

A adaptação de populações microbianas ocorre mais comumente pela indução de enzimas necessárias para a biodegradação, seguida por um aumento na população de organismos biodegradadores (MAIER; GENTRY, 2015; PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011; ZHU et al., 2001). A degradação desses contaminantes requer também um segundo tipo de adaptação que envolve uma mudança genética, como uma mutação ou uma transferência genética. Isso resulta no desenvolvimento de novas capacidades metabólicas. O tempo necessário para uma adaptação, a qual requer uma mudança genética ou uma seleção e desenvolvimento de uma comunidade adaptada ainda não é previsível, mas o processo pode exigir de semanas a anos ou pode não ocorrer (MAIER; GENTRY, 2015; VANDECASTEELE; JONES, 2008b).

Em nosso estudo, o resíduo de perfuração de poço de petróleo gerado foi armazenado até a sua posterior manutenção. Este resíduo, portanto, permaneceu por longos

períodos de tempo aguardando tratamento adequado. Como descrito por NAPP e colaboradores (2018), esta amostra contém uma alta quantidade de matéria orgânica (120 g/dm), provavelmente proveniente dos hidrocarbonetos residuais encontrados no resíduo (108,9 g/kg). Desta forma, devido a alta concentração de poluentes, este resíduo de perfuração possivelmente tem sua população microbiana previamente selecionada.

Neste contexto, abordagens metagenômicas têm emergido como uma estratégia para analisar comunidades microbianas no ambiente, possibilitando o acesso ao potencial genético dos microrganismos presentes (MIRETE; MORGANTE; GONZÁLEZ-PASTOR, 2016). Vários estudos metagenômicos descrevem microrganismos capazes de se desenvolver em ambientes petroquímicos com capacidades metabólicas adequadas para a degradação de numerosos hidrocarbonetos (AN et al., 2013; CZARNY et al., 2017; LIU et al., 2018; MICHAS et al., 2017).

Conseqüentemente, nosso estudo analisou o perfil taxonômico e a presença de genes relacionados à biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos mais abundantes, os quais foram selecionados por dois diferentes meios de cultura, utilizados para o enriquecimento (LB e PD). Nossos resultados demonstraram que ambos os enriquecimentos selecionaram preferencialmente o desenvolvimento de microrganismos procariotos, com a presença em maior abundância do filo Proteobacteria.

Entretanto, os diferentes enriquecimentos utilizados foram responsáveis por selecionar comunidades bacterianas distintas. Na amostra enriquecida em LB, as principais bactérias encontradas pertenciam aos gêneros *Pseudomonas* (10,5%), *Bacillus* (6,82%), *Bordetella* (2,51%), e na amostra enriquecida com PD pertenciam a *Stenotrophomonas* (26.9%), *Pantoea* (6.3%), *Brevundimonas* (3.65%). Segundo WU e colaboradores (2013) mudanças nos meios de culturas podem refletir em diferentes composições microbianas.

Todos os gêneros encontrados em maior abundância nos enriquecimentos já foram previamente descritos em ambientes associados ao petróleo e com potencial atividade para degradação de hidrocarbonetos (ARSLAN et al., 2014; CERQUEIRA et al., 2012; CHAUDHARY et al., 2015; DAS; CHANDRAN, 2011a; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; DAS; KAZY, 2014; OBI; ATAGANA; ADELEKE, 2016; VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2007).

Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos em outros trabalhos na literatura, onde Proteobacteria é o filo dominante encontrado em amostras de resíduos petroquímicos (DÖRR DE QUADROS et al., 2016; JOSHI et al., 2014; YADAV et al., 2015). Os membros deste filo têm um papel importante nos processos de degradação de hidrocarbonetos com diversas funções metabólicas (JOSHI et al., 2014).

Entretanto, em um trabalho realizado por Guerra e colaboradores (2018), foi descrito o isolamento de diferentes microrganismos a partir de um resíduo de perfuração de poço de petróleo proveniente da mesma região do resíduo utilizado neste trabalho (Rio Grande do Norte, Brasil), sendo as espécies de maior abundância pertencentes ao filo Firmicutes. Os enriquecimentos foram realizados em meios de cultivo LB e YPD com temperatura de incubação de 37 °C, e posterior passagem para meio BH com petróleo como única fonte de carbono, corroborando que diferentes condições de cultivo, como temperatura e nutrientes, influenciam diretamente na composição da comunidade microbiana.

As análises funcionais dos dois metagenomas demonstram a presença de vários genes de vias metabólicas relacionadas à degradação aeróbica de compostos alifáticos e aromáticos pela comunidade microbiana, as quais também foram descritas por Guerra e colaboradores (2018). Diversas enzimas relacionadas à degradação de alcanos como

aldeído desidrogenase, álcool desidrogenase, alcano hidroxilase, metano monooxigenase e enzimas que pertencem a uma família de citocromo P-450 estavam presentes nos metagenomas.

Nossos resultados também apresentaram um elevado número de enzimas oxigenases, como 1,2-catecol dioxigenase (C1,2O), 2,3-catecol dioxigenase (C2,3O), 3,4-protocatecol dioxigenase (P3,4O) e 4,5-protocatecol dioxigenase (P4,5O) em ambas as amostras metagenômicas. A degradação aeróbica clássica dos hidrocarbonetos aromáticos geralmente gera compostos intermediários por hidroxilação, como catecol (1,2-dihidroxibenzeno) ou protocatecol (3,4-di-hidroxibenzoato), sendo estas enzimas listadas acima as responsáveis por esta conversão (FUCHS; BOLL; HEIDER, 2011).

Além disso, foi identificado um número significativo de proteínas envolvidas na síntese de biossurfactantes (18,14 e 17,92% para LBE e PDE, respectivamente). Estes dados corroboram com os resultados obtidos na produção de biossurfactantes pelos consórcios, onde foi observado índices de emulsificação satisfatórios superiores a 60%, e resultados positivos para os testes de colapso da gota, dispersão do óleo e atividade hemolítica.

Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura que classificaram os gêneros mais abundantes encontrados nas nossas amostras como bioemulsificadores com o potencial de aumentar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos para melhorar a biodegradação (BEZZA; CHIRWA, 2017; CERQUEIRA et al., 2012; DAS; CHANDRAN, 2011a; DAS; KAZY, 2014; DENG et al., 2014; OBI; ATAGANA; ADELEKE, 2016; VASILEVA-TONKOVA; GESHEVA, 2007; VIÑAS et al., 2005).

A abordagem metagenômica também nos permitiu avaliar a relação do cometabolismo entre as espécies presentes. Por exemplo, está bem estabelecido que a



produção de biossurfactantes contribui para a solubilização sistêmica parcial ou completa do poluente original (DELL'ANNO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015; PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011), e essas moléculas são produzidas por uma ampla variedade de organismos de forma constitutiva ou induzida, a partir de vários substratos, incluindo açúcares, óleos e resíduos (CAMEOTRA; SINGH, 2008b; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011; S. OLIVEIRA et al., 2017). Desta forma, nossos resultados demonstraram esse comportamento de cometabolismo e sinergismo, nossa abordagem é validada positivamente com a alta porcentagem de degradação que obtivemos de até 50% em apenas 15 dias de tratamento com os consórcios microbianos produzidos, a maioria dos estudos tem esse percentual somente após várias semanas (CERQUEIRA et al., 2011b; DÖRR DE QUADROS et al., 2016). Os resultados obtidos de avaliação de degradação estão de acordo com nossos dados funcionais e são considerados satisfatórios. Especialmente quando comparados com o curto período de tempo utilizado para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em nosso trabalho (15 dias).

De fato, a degradação de hidrocarbonetos pelas comunidades microbianas depende da composição da comunidade e de sua resposta adaptativa à presença de hidrocarbonetos. Segundo HEAD e colaboradores (2006) estudos de biorremediação tendem a enfatizar os microrganismos que degradam os contaminantes. No entanto, esses microrganismos fazem parte de uma rede ecológica, que envolve muitas interações diretas e indiretas com outros membros da comunidade e com o meio ambiente (e, portanto, é influenciada por variáveis ambientais, como a disponibilidade de nutrientes ou parâmetros físico-químicos). Tais interações incluem competição pela limitação de nutrientes, predação por protozoários, lise por interações fago e cooperações que aumentam a degradação. Esses exemplos mostram que o sucesso da biodegradação não é determinado apenas pelos microrganismos

degradadores, possivelmente explicando por que muitas vezes a bioaugmentação não aumenta as taxas de biodegradação, e indicam que uma maneira alternativa de aumentar a biorremediação poderia ser inocular no meio ambiente ou promover o crescimento de organismos que desempenham importantes funções secundárias.

De fato, mais de 170 gêneros de microrganismos foram listados como capazes de degradar ou transformar hidrocarbonetos (CHRONOPOULOU et al., 2015; DAS; CHANDRAN, 2011b; HEAD; JONES; RÖLING, 2006; SARKAR et al., 2017; ZHU et al., 2001). Isso foi fundamental para entender algumas das vias envolvidas na biodegradação de compostos alifáticos e aromáticos. No entanto, estudos recentes têm ajudado a aumentar nosso conhecimento sobre a diversidade microbiana e vias bioquímicas envolvidas na degradação microbiana de hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que a lista de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos continua a se expandir, além da descoberta de novos biosurfactantes, enzimas e/ou vias metabólicas funcionais envolvidas na biodegradação. Além disso, sabe-se que apenas cerca de 1% da microbiota pode ser cultivada por métodos tradicionais (OLIVEIRA et al., 2015; OULAS et al., 2015).

Neste sentido, uma pequena parcela das comunidades está atualmente descrita, e a lista de degradadores aumenta à medida que a microbiota pode ser explorada, ligando as técnicas tradicionais de cultivo e a abordagem metagenômica.

Embora os ensaios metagenômicos sejam uma ferramenta fundamental nas análises taxonômicas e funcionais, o isolamento de microrganismos é essencial na caracterização das propriedades específicas (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010). Além disso, alguns autores utilizam o isolamento na validação dos dados metagenômicos (JOSHI et al., 2014). Assim, a partir dos consórcios produzidos e de outras formas de cultivo, as quais se utilizou meios de cultura com baixa concentração de nutrientes (BH e água marinha),

isolados microbianos foram identificados e selecionados quanto à degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes.

Desta forma, um microrganismo pertencente ao gênero *Rhodococcus* demonstrou possuir atividades metabólicas importantes para a degradação de hidrocarbonetos durante a avaliação com petróleo bruto.

O petróleo utilizado durante os ensaios de degradação apresentou possuir concentrações predominantes de compostos alifáticos na sua composição. Neste contexto, o microrganismo selecionado neste trabalho apresentou uma degradação praticamente completa dessas frações. Enzimas da família AlkB e citocromo P450, além de alcano hidroxilases têm sido amplamente descritas para a degradação de cadeias de alcanos. Diversos gêneros de bactérias foram descritos na literatura com a presença de genes referentes a estas enzimas, incluindo *Rhodococcus* (AMOURIC et al., 2010; FUNHOFF; VAN BEILEN, 2007; JURELEVICIUS et al., 2013; NIE et al., 2014; PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011).

Os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia carbônica intermediária (C10 a C18) são compostos utilizados pelos microrganismos mais prontamente que os alifáticos de cadeias curtas (solventes) e longas (solubilidade diminui com o aumento do número de carbonos). Assim, *n*-alcanos de cadeia longa são utilizados mais lentamente devido à baixa biodisponibilidade resultante da sua solubilidade extremamente baixa. Em contrapartida, os *n*-alcanos de cadeia curta possuem uma maior solubilidade aquosa, a qual os torna tóxicos para muitas células (MAIER; GENTRY, 2015). Assim, as taxas de degradação do *n*-alcano irão diferir dependendo se o substrato está presente como um composto puro ou numa mistura de compostos. Estes fatores pareceram não influenciar na capacidade de

degradação do microrganismo selecionado, já que este foi capaz de utilizar cadeias de todos os tamanhos.

Em contrapartida, não foi observada a degradação dos compostos aromáticos pelo microrganismo, estes hidrocarbonetos são formados por anéis condensados, e por isso são transformados muito mais lentamente, frequentemente como resultado cometabólico. Isto é devido à biodisponibilidade limitada destes compostos. Estes PAHs têm uma solubilidade aquosa muito limitada. No entanto, tem sido demonstrado que a exposição crônica a compostos aromáticos pode resultar em aumento das taxas de transformação devido à adaptação da população microbiana (GIBSON, 1984; MAIER; GENTRY, 2015; MÜLLER, 2009; VANDECASTEELE; JONES, 2008b).

Segundo Mohamed e colaboradores (2006), a biodegradabilidade dos componentes do petróleo segue uma ordem preferencial de degradação: (i) *n*-alcanos, (ii) cadeias alceno ramificadas, (iii) alcenos ramificados, (iv) monoaromáticos, (v) cicloalcanos, (vi) poliaromáticos e, (vii) cadeias de asfalto.

Outra propriedade importante relacionada com a biodegradação de compostos hidrofóbicos é a capacidade de produção de biossurfactantes.

Desta forma, a procura por microrganismos produtores de biossurfactante com valores baixos de CMC, baixa toxicidade e alta atividade emulsificante tem aumentado. Sabe-se que diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos, são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares e atividade superficial (BANAT et al., 2010; MESBAIAH et al., 2016; MORO et al., 2018; RUGGERI et al., 2009). Porém, o crescimento microbiano em substratos hidrofóbicos e a produção de biossurfactante não são necessariamente relacionados, devido

ao fato de os biossurfactantes também desempenharem diversos papéis fisiológicos para a célula (MAIER; GENTRY, 2015).

O isolado *Rhodococcus* foi submetido a experimentos de produção de biossurfactantes em meios contendo hidrocarbonetos de petróleo, e este demonstrou uma capacidade de redução da tensão superficial no meio de 68,7 para 33,9 mN/m após 7 dias de cultivo. Dados da literatura sugerem que surfactantes eficientes apresentam baixos valores de CMC, ou seja, reduzem a energia livre do sistema, substituindo as moléculas de alta energia na interface, e assim, diminuindo a tensão superficial. Sendo assim, para um biossurfactante ser considerado eficaz, este deve reduzir a tensão superficial do meio de 72 para 35 mN/m (CHRZANOWSKI et al., 2012; MESBAIAH et al., 2016; MULLIGAN, 2009; MULLIGAN; MUDHOO; SHARMA, 2014). Desta forma, podemos sugerir que a bactéria isolada neste estudo produz moléculas ativas da classe de biossurfactantes de baixo peso.

Além disso, análises filogenéticas realizadas com as sequências 16S de rDNA do isolado *Rhodococcus*, revelaram que este microrganismo tem grande potencial de ser uma espécie ainda desconhecida deste gênero.

As espécies do gênero *Rhodococcus* são caracterizadas quimiotaxonomicamente pela presença do ácido meso-2,6-diaminopimélico; arabinose e galactose nos hidrolisados de células inteiras; MK-8 (H2) e MK-8 (H4) como as menaquinonas predominantes; e difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilinositol manosídeos como os principais fosfolipídeos. Os ácidos micólicos também estão presentes nos membros do gênero *Rhodococcus*. O gênero *Rhodococcus* passou por uma expansão considerável nos últimos anos e, no momento, 39 espécies com nomes válidos são

reconhecidas na literatura (FINNERTY, 1998; GUO et al., 2015; GURTLER; SEVIOUR, 2010).

Nos últimos anos, mudanças consideráveis na classificação de gêneros têm ocorrido, algumas espécies têm sido combinadas, transferidas para outros gêneros ou reclassificadas em um novo gênero, e novas espécies têm sido descritas (GUO et al., 2015).

Recentemente, a bactéria *Rhodococcus aglutinans*, foi isolada, classificada e caracterizada por Guo e colaboradores (2015). A análise filogenética realizada para nosso isolado apresentou grande proximidade com esta espécie, porém existe cerca de 70% de chances de estes dois microrganismos serem espécies divergentes. Assim, experimentos adicionais são necessários para confirmar a potencial nova espécie.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo possibilitou (i) formular dois consórcios microbianos a partir de enriquecimento com diferentes meios de cultivo (LB e PD). Adicionalmente, (ii) a partir de um estudo comparativo realizado para avaliar o efeito das diferentes condições de enriquecimentos empregadas na composição taxonômica e funcional dos dois metagenomas gerados (LBE e PDE), observamos que estes exibem diferenças significativas em relação a sua diversidade e também apresentam genes para produção de biossurfactantes e degradação de hidrocarbonetos. Assim, nosso trabalho demonstrou que a análise metagenômica é uma metodologia eficiente e prática que pode ser utilizada para a melhor compreensão de comunidades microbianas presentes em resíduos de perfuração de poços de petróleo. Além disso, foi possível demonstrar que (iii) o enriquecimento com meio LB exibiu capacidade de degradação superior ao observado com meio PD, isto ocorreu provavelmente devido a maior abundância de genes relacionados a enzimas de degradação de diferentes xenobióticos. Assim, a diversidade microbiana heterogênea relatada no consórcio LBE apresenta forte potencial em relação à remediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Somado a isso, o presente estudo também possibilitou (iv) isolar e caracterizar microrganismos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo a partir de ensaios de bioprospecção utilizando o resíduo de perfuração de poço de petróleo. Após a realização de diferentes ensaios de biorremediação, a bactéria *Rhodococcus* sp. foi selecionada com a melhor capacidade de degradação de hidrocarbonetos presentes em petróleo bruto. Análises filogenéticas demonstraram que esta é uma bactéria ainda não descrita na literatura, ressaltando ainda mais o seu potencial de aplicação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

## 6 PERSPECTIVAS

O presente estudo levantou questões importantes sobre a degradação de hidrocarbonetos de petróleo por populações e isolados microbianos.

Quanto à utilização de consórcios microbianos, é relevante realizar a avaliação de vias de metabolismo de hidrocarbonetos específicos, presentes durante a interação de diferentes gêneros e espécies microbianas no decorrer das fases de degradação, bem como a caracterização dos compostos metabólicos produzidos. Ainda neste aspecto, análises de expressão gênica de enzimas importantes para os processos de degradação devem ser realizadas, através da quantificação por PCR em tempo real.

Quanto à utilização de isolados microbianos, diversos aspectos necessitam ser testados experimentalmente. Inicialmente, é necessário compreender a cinética de crescimento das células de *Rhodococcus* sp. durante os ensaios de degradação de hidrocarbonetos alifáticos, através da contagem de unidades formadoras de colônia (CFU). Isto auxiliará a compreender melhor em quais momentos as células bacterianas podem estar atuando na mineralização dos compostos testados. Além disso, a determinação do perfil de biosurfactantes produzidos por *Rhodococcus* sp. se torna extremamente necessária para elucidar os processos de degradação empregados pelo isolado, a qual pode ser avaliada através de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-HRMS). Nossos resultados também sugerem que o microrganismo *Rhodococcus* sp. isolado neste trabalho pertence à uma nova espécie do gênero, esta hipótese necessita ser confirmada por testes fenotípicos, quimiotaxonômicos e moleculares. Além disso, como a utilização desta bactéria para degradação de hidrocarbonetos alifáticos presentes no petróleo CasaBlanca foi



comprovada, análises de interação com microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos se tornam interessantes.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, tanto pelos consórcios microbianos quanto para o microrganismo selecionado, a avaliação da degradação de hidrocarbonetos de petróleo em tratamentos de biorremediação em larga escala se torna necessária. Outro fator importante é a determinação da degradação de petróleos de diferentes origens. Estes dois tipos de análise combinados, podem demonstrar mais claramente as possíveis aplicações dos consórcios produzidos e de *Rhodococcus* sp. em ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ANSARY, M. S.; AL-TABBAA, A. Stabilisation/solidification of synthetic petroleum drill cuttings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 2, p. 410–421, 2007.

ALVAREZ, M. H. **Biology of Rhodococcus**. (2010).

AMOURIC, A. et al. 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.

AN, D. et al. Metagenomics of Hydrocarbon Resource Environments Indicates Aerobic Taxa and Genes to be Unexpectedly Common. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 18, p. 10708–10717, 17 set. 2013.

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2018**. (<http://www.anp.gov.br/>). Acesso em: 5 de agosto de 2018.

ARSLAN, M. et al. Nutrients Can Enhance the Abundance and Expression of Alkane Hydroxylase CYP153 Gene in the Rhizosphere of Ryegrass Planted in Hydrocarbon-Polluted Soil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111208, 31 out. 2014.

ARULAZHAGAN, P.; VASUDEVAN, N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 388–394, 2011.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 1, p. 180–209, mar. 1981.

ATLAS, R. M.; HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 16, p. 6709–6715, 15 ago. 2011.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 180, nov. 2016.

BALACHANDRAN, C. et al. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 83–90, 2012.

BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, jun. 2010.

BAMFORTH, M. S.; SINGLETON, I. **Bioremediation of polycyclic aromatic**

**hydrocarbons: Current knowledge and future directions.** (2005). v. 80

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 218–227, 5 jan. 2017.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.

BOOPATHY, R.; SHIELDS, S.; NUNNA, S. Biodegradation of crude oil from the BP oil spill in the marsh sediments of southeast Louisiana, USA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1560–1568, 2012.

BORSATO, D.; GALAO, O. F. E M. **combustíveis Fósseis - Carvão e Petróleo**. 1. ed. Londrina: (2009).

BOUFADEL, M. C.; GENG, X.; SHORT, J. Bioremediation of the Exxon Valdez oil in Prince William Sound beaches. **Marine pollution bulletin**, v. 113, n. 1–2, p. 156–164, dez. 2016.

BRAGG, J. R. et al. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. **Nature**, v. 368, p. 413, 31 mar. 1994.

BRZESZCZ, J.; KASZYCKI, P. Aerobic bacteria degrading both n -alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. **Biodegradation**, 2018.

CACHADA, A. et al. The prediction of PAHs bioavailability in soils using chemical methods: State of the art and future challenges. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 463–480, 2014.

CAI, Q. et al. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 402–410, set. 2014.

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

CAMILLI, R. et al. Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at deepwater horizon. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 201–204, 2010.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 2079–2110.

CERQUEIRA, V. S. et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 11003–11010, 2011.

CERQUEIRA, V. S. et al. 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.

CHARTRAIN, M. et al. Bioconversion of indene to cis (1S,2R) indandiol and trans (1R,2R) indandiol by *Rhodococcus* species. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 550–558, 1998.

CHAUDHARY, D. K.; KIM, J. *Rhodococcus olei* sp. nov., with the ability to degrade petroleum oil, isolated from oil-contaminated soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1749–1756, maio 2018.

CHAUDHARY, P. et al. Identification and analysis of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)—biodegrading bacterial strains from refinery soil of India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 6, p. 391, 2015.

CHEN, W.-C.; JUANG, R.-S.; WEI, Y.-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015.

CHEN, Z. et al. Supercritical water oxidation of oil-based drill cuttings. **Journal of Hazardous Materials**, v. 332, p. 205–213, 15 jun. 2017.

CHRONOPOULOU, P.-M. et al. Generalist hydrocarbon-degrading bacterial communities in the oil-polluted water column of the North Sea. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 434–447, 24 maio 2015.

CHRZANOWSKI, Ł. et al. Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 328–335, 2012.

CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 401–419, 9 fev. 2012.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

CZARNY, J. et al. **Metagenomic Analysis of Soil Bacterial Community and Level of Genes Responsible for Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons**. (2010). v. 66

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1229–1234, 2008.

- DAS, R.; KAZY, S. K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 12, p. 7369–7389, 2014.
- DE CARVALHO, C. C. C. R. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 125–136, 2012.
- DE FILIPPO, C. et al. Bioinformatic approaches for functional annotation and pathway inference in metagenomics data. **Briefings in Bioinformatics**, v. 13, n. 6, p. 696–710, 20 nov. 2012.
- DELL'ANNO, F. et al. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. **Marine Environmental Research**, v. 137, p. 196–205, 2018.
- DENG, M.-C. et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 83, n. 1, p. 79–86, 2014.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, mar. 1997.
- DÖRR DE QUADROS, P. et al. Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 115, p. 90–101, 2016.
- DRILLING, U. S. N. C. ON THE B. P. D. H. O. S. AND O. **Deep water : the Gulf oil disaster and the future of offshore drilling : report to the President**. [s.l.] [Washington, D.C.]: National Commission on the BP Deepwater Horizon Oil Spill and Offshore Drilling : For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O., [2011], [s.d.].
- DUDHAGARA, P. et al. Web Resources for Metagenomics Studies. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 296–303, out. 2015.
- EL FANTROUSSI, S.; 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.
- FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–16, 2014.
- FERREIRA, V. R. et al. Optimization of an analytical protocol for the extraction, fractionation and determination of aromatic and aliphatic hydrocarbons in sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2012.
- FINNERTY. The genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 195–210, 1998.

FINNERTY, W. R. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. **Annual review of microbiology**, v. 46, p. 193–218, 1992.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I. M. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 672, p. 121–134, 2010.

FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. **Nat Rev Micro**, v. 9, n. 11, p. 803–816, nov. 2011.

FUENTES, S. et al. **Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014.

FULLER, C. et al. Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 23, n. 12, p. 2941–2949, dez. 2004.

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

GHOSAL, D. et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, 2016.

GIBSON, D. T. **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker Inc., 1984.

GRIFOLL, M. et al. **Actions of a versatile Fluorine-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds**. (1995). v. 61

GUERRA, A. B. et al. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 869–880, 2018.

GUO, Q.-Q. et al. *Rhodococcus agglutinans* sp. nov., an actinobacterium isolated from a soil sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 1271–1280, 2015.

GURTLER, V.; SEVIOUR, R. J. **Systematics of Members of Genus *Rhodococcus* (Zopf, 1891) Emend Goodfellow et al. 1998**. (2010).

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. 1999

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured

Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, dez. 2004.

HARAYAMA, S. Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 565–601, 1992.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 173, 1 mar. 2006.

HU, G.; LI, J.; ZENG, G. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 470–490, 2013.

HUC, A. et al. **Heavy Crude Oils; From geology to upgrading, an overview**. (2011).

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. **Genome research**, v. 17, n. 3, p. 377–386, mar. 2007.

JACQUES, R. J. S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 3, p. 143–150, 2005.

JAFARINEJAD, S. 1 - Introduction to the Petroleum Industry BT - Petroleum Waste Treatment and Pollution Control. In: [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2017a. p. 1–17.

JAFARINEJAD, S. 2 - Pollutions and Wastes From the Petroleum Industry BT - Petroleum Waste Treatment and Pollution Control. In: [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2017b. p. 19–83.

JAFARINEJAD, S. 3 - Environmental Impacts of the Petroleum Industry, Protection Options, and Regulations BT - Petroleum Waste Treatment and Pollution Control. In: [s.l.] Butterworth-Heinemann, 2017c. p. 85–116.

JAIN, D. K. et al. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 4, p. 271–279, 1991.

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

JOSHI, M. N. et al. Metagenomics of petroleum muck: revealing microbial diversity and depicting microbial syntrophy. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 8, p. 531–544, 2014.

JURELEVICIUS, D. et al. The Use of a Combination of *alkB* Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

KADALI, K. K. et al. Mineralisation of Weathered Crude Oil by a Hydrocarbonoclastic Consortia in Marine Mesocosms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 7, p. 4283–4295, 2012.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 71, n. 2, p. 95–122, 2004.

KILLOPS, S. D.; KILLOPS, V. J. **Introduction to Organic Geochemistry**. [s.l: s.n.].  
KIM, D. et al. Biotechnological potential of Rhodococcus biodegradative pathways. **Journal of microbiology and biotechnology**, maio 2018.

KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; YANA, K. Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 454–457, fev. 1982.

KOSTKA, J. E. et al. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, 6 nov. 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016.

KUNIN, V. et al. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 4, p. 557–78, Table of Contents, dez. 2008.

KUYUKINA, M. S. et al. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic Rhodococcus actinobacteria with diverse immunomodulatory activities. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 559–568, 2015.

LADINO-ORJUELA, G. et al. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria BT - Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237. In: DE VOOGT, W. P. (Ed.). Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 105–121.

LADOUKAKIS, E.; KOLISIS, F. N.; CHATZIIOANNOU, A. A. **Integrative workflows for metagenomic analysis** **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2014.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2327–2339, 12 mar. 2013.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305–315, set. 1990.

LEONARD, S. A.; STEGEMANN, J. A. Stabilization/solidification of petroleum drill cuttings: leaching studies. **Journal of hazardous materials**, v. 174, n. 1–3, p. 484–491, fev. 2010.

LIU, Y.-F. et al. Metabolic capability and in situ activity of microorganisms in an oil reservoir. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 5, 2018.



LOPEZ, Z. et al. Simultaneous biodegradation of creosote-polycyclic aromatic hydrocarbons by a pyrene-degrading Mycobacterium. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 165–172, fev. 2008.

MAIER, R.; J. GENTRY, T. **Microorganisms and Organic Pollutants**. (2015).

MARCHAL, R. et al. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 441–448, 2003.

MARGESIN, R.; FONTEYNE, P.-A.; REDL, B. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by Rhodococcus spp. and basidiomycetous yeasts. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 68–75, 2005.

MCCLELLAND, R. Gram's stain: the key to microbiology. **MLO: medical laboratory observer**, v. 33, n. 4, p. 20- 22,21-25, abr. 2001.

MESBAIAH, F. Z. et al. Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading Paenibacillus sp. under thermophilic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 14221–14230, 2016.

MEYER, D. D. Avaliação da Biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em solos com diferentes granulometrias. p. 161, 2011.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 386, 19 set. 2008.

MICHAS, A. et al. More than 2500 years of oil exposure shape sediment microbiomes with the potential for syntrophic degradation of hydrocarbons linked to methanogenesis. **Microbiome**, v. 5, p. 118, 11 set. 2017.

MICHEL, J. Chapter 37 - 1991 Gulf War Oil Spill. In: FINGAS, M. B. T.-O. S. S. AND T. (Ed.). . Boston: Gulf Professional Publishing, 2011. p. 1127–1132.

MIRETE, S.; MORGANTE, V.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Functional metagenomics of extreme environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 143–149, 2016.

MOHAMED, M. E. et al. 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.

MORO, G. V et al. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. **Microbial biotechnology**, maio 2018.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. **Towards commercial production of microbial surfactants (Review)**. (2006). v. 24

MUELLER, G. J.; J. CHAPMAN, P.; HAP PRITCHARD, P. **Creosote-contaminated sites: Their potential for bioremediation.** (1989). v. 23

MÜLLER, R. **Book Review: Biorefineries – Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions.** By B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (Eds.). (2007). v. 7

MÜLLER, R. **Book Review: Petroleum Microbiology. Concepts, Environmental Implication, Industrial Applications.** By Jean-Paul Vandecasteele (Ed., IFP Publications). (2009). v. 32

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.

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

MULLIGAN, C. N.; MUDHOO, A.; SHARMA, S. K. **Biosurfactants : research trends and applications**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1201/b16383>>

NAPP, A. P. et al. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. **Chemosphere**, v. 209, p. 7–16, out. 2018.

NIE, Y. et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–11, 2014.

NOPARAT, P.; MANEERAT, S.; 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.

NYLUND, L. et al. Genotoxic effects and chemical compositions of four creosotes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 265, n. 2, p. 223–236, 1992.

OBI, L. U.; ATAGANA, H. I.; ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1946, 9 nov. 2016.

OLIVEIRA, J. S. et al. BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2015, p. bav033, 31 mar. 2015.

OLIVEIRA, S. J. et al. **Biogeographical distribution analysis of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing genes suggests that near-equatorial biomes have higher abundance of genes with potential for bioremediation.** [s.l: s.n.]. v. 17

ORTEGA-GONZÁLEZ, D. K. et al. Degradation of benzene, toluene, and xylene isomers by a bacterial consortium obtained from rhizosphere soil of *Cyperus* sp. grown in a petroleum-contaminated area. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 569–577, 2013.

OULAS, A. et al. Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, 2015.

OWSIANIAK, M. et al. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 545–553, set. 2009.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 18 jan. 2011.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 475193, 24 jul. 2011.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. et al. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1589–1595, abr. 2008.

PRITCHARD, P. H. Bioremediation as a technology: Experiences with the Exxon Valdez oil spill. **Journal of Hazardous Materials**, v. 28, n. 1, p. 115–130, 1991.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D590–D596, 27 jan. 2013.

R. BRAGG, J. et al. **Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez oil spill**. [s.l: s.n.]. v. 1993

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. **Biotechnology**, 2008.

RETAMAL-MORALES, G. et al. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* B7g, a biosurfactant producing actinobacterium. **Journal of Biotechnology**, v. 280, n. June, p. 38–41, 2018.

RIZZO, A. C. DE L. et al. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. 2006.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477–2490, 2009.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, jun. 2002.

RUGGERI, C. et al. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 7, p. 936–942, 2009.

SANTISI, S. et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, 2015.

SARKAR, J. et al. Biostimulation of Indigenous Microbial Community for Bioremediation of Petroleum Refinery Sludge. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1407, 21 set. 2016.

SARKAR, P. et al. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 242, 2017.

SCHNEIKER, S. et al. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 997, 30 jul. 2006.

SCOMA, A.; YAKIMOV, M. M.; BOON, N. Challenging Oil Bioremediation at Deep-Sea Hydrostatic Pressure. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1203, 3 ago. 2016.

SEKINE, M. et al. Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 2, p. 334–346, fev. 2006.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, p. 539, out. 2011.

SPEIGHT, J. G. **The Chemistry and Technology of Petroleum, Fifth Edition**. [s.l.] Taylor & Francis, 2014.

SPIGOLON, A. L. D. et al. Evaluation of the petroleum composition and quality with increasing thermal maturity as simulated by hydrous pyrolysis: A case study using a Brazilian source rock with Type I kerogen. **Organic Geochemistry**, v. 83–84, p. 27–53, 2015.

TECHTMANN, S. M.; HAZEN, T. C. Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 10, p. 1345–1354, out. 2016.

TREMBLAY, J. et al. Chemical dispersants enhance the activity of oil- and gas condensate-degrading marine bacteria. **The ISME journal**, v. 11, n. 12, p. 2793–2808, dez. 2017.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; 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, abr. 2011.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. Expanding the alkane oxygenase toolbox: New enzymes and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 3 SPEC. ISS., p. 308–314, 2005.

VAN BEILEN, J. B.; FUNHOFF, E. G. 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.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VANDECASTEELE, J.-P.; JONES, T. **Petroleum microbiology. Concepts, environmental implications, industrial applications Volume 2 Volume 2**. Paris: Editions Technip, 2008a.

] VANDECASTEELE, J.-P.; JONES, T. **Petroleum microbiology. Concepts, environmental implications, industrial applications Vol. 1 Vol. 1**. Paris: Editions Technip, 2008b.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, ago. 2010.

VASCONCELOS, S. P. **Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2006.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Biosurfactant Production by Antarctic Facultative Anaerobe *Pantoea* sp. During Growth on Hydrocarbons. **Current Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 136–141, 2007.

VILA, J.; GRIFOLL, M. Actions of *Mycobacterium* sp. strain AP1 on the saturated- and aromatic-hydrocarbon fractions of fuel oil in a marine medium. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6232–6239, out. 2009.

VIÑAS, M. et al. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7008–7018, 27 nov. 2005.

VOLLHARDT, K. P. C. E SCHORE, N. E. **Química orgânica: estrutura e função**. 4. ed. Porto Alegre: (2004).

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 22 ago. 2007.

WARD, O. P. et al. **Petroleum Microbiology**. (2009).

WU, M. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. **Environmental Pollution**, v. 178, 2013.

WU, M. et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 107, 2016.

A. WILLUMSEN, P.; KARLSON, U. **Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers.** [s.l: s.n.]. v. 7  
ABDEL-MAWGOUD, A. M. et al. **Biosurfactants.** [s.l: s.n.]. v. 20

YADAV, T. C. et al. Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 24–32, 2015.

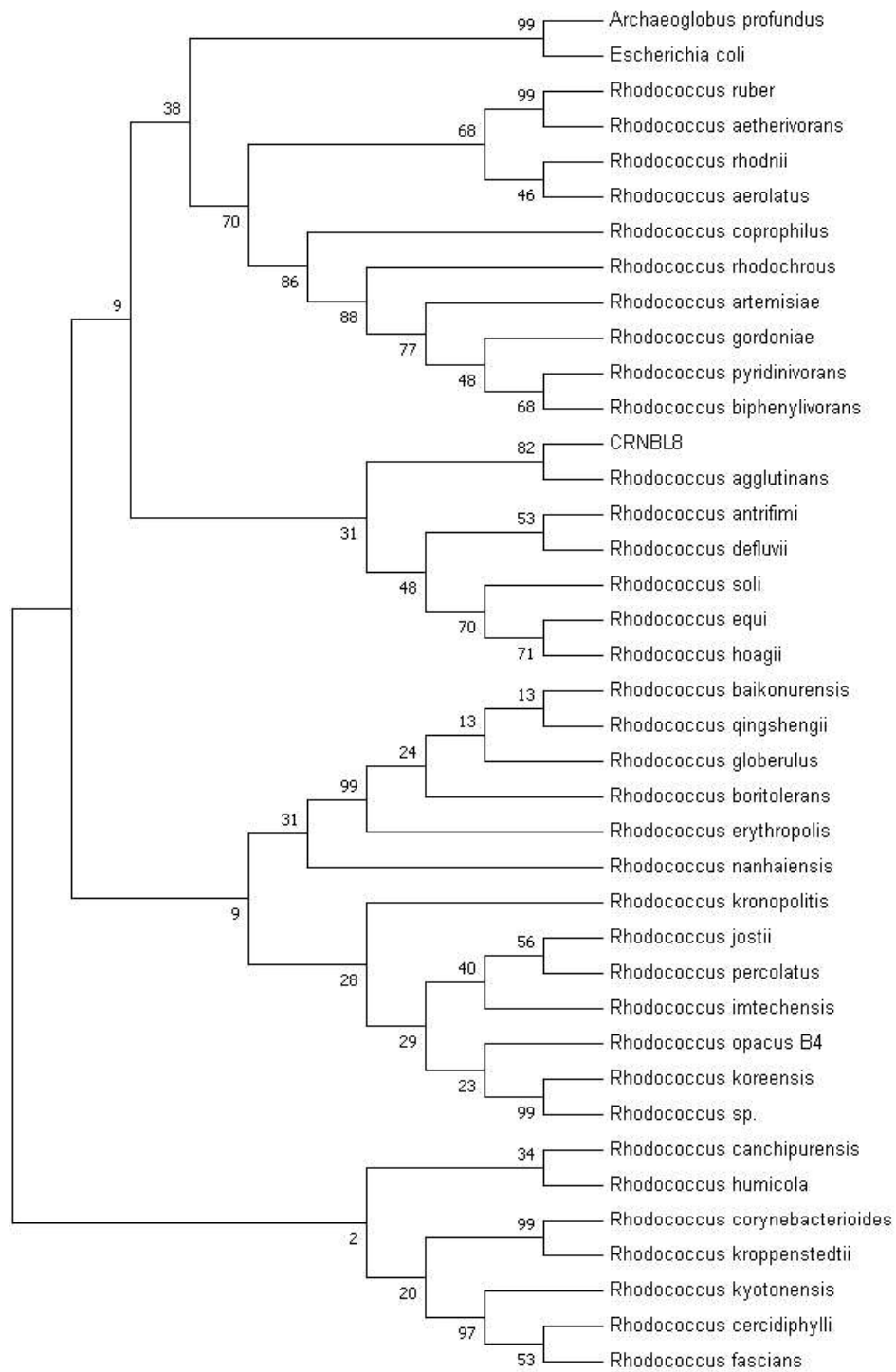
YAKIMOV, M. M. et al. Characterization of antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. **The new microbiologica**, v. 22, n. 3, p. 249–256, jul. 1999.

YANG, H.-Y. et al. Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 18, p. 11086–11093, set. 2014.

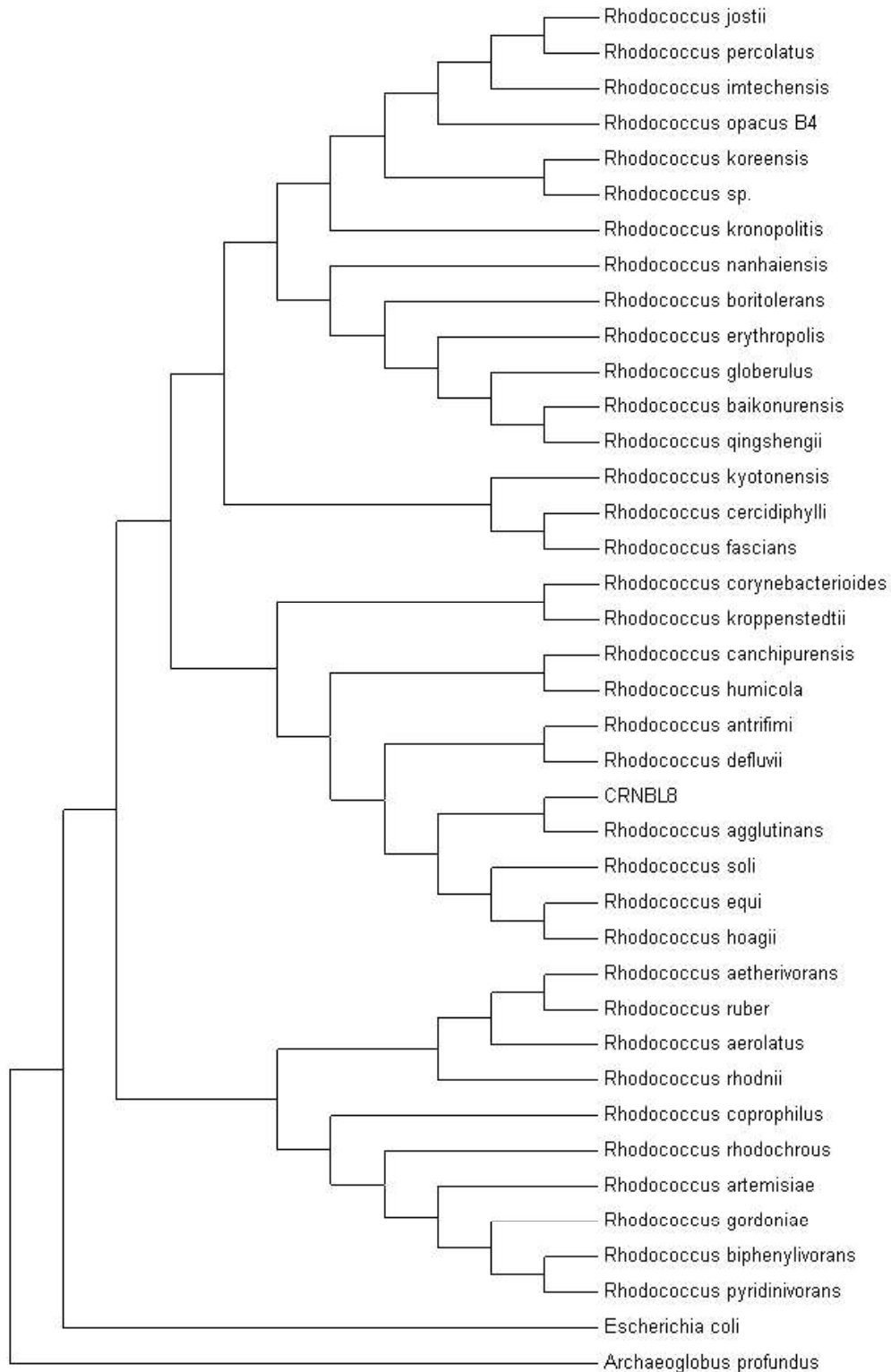
ZHU, X. et al. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. **Environmental Protection**, p. 163, 2001.

## 8 APÊNDICES

### A1. Árvore filogenética construída pelo método Maximum Parsimony.



## A2. Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-joining.





## 9 CURRICULUM VITAE resumido

*NAPP, A. P.; NAPP, AMANDA P.; NAPP, AMANDA.*

### DADOS PESSOAIS

**Nome:** Amanda Pasinato Napp.

**Local e data de nascimento:** Jataí, Goiás, Brasil, 9 de junho de 1989.

**Endereço profissional:** Av. Bento Gonçalves, 9500; Setor 4; Prédio 43421; Lab. 220;  
Porto Alegre, RS; CEP: 91501-970.

**Telefone profissional:** +55 51 33087767

**E-mail:** amanda.apn@gmail.com

### FORMAÇÃO

**Curso de graduação:** Biomedicina, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Período:  
2007-2010.

Título: Avaliação do perfil hormonal em usuários crônicos de *Cannabis sativa*.

Orientador: Alexandre Ehrhardt.

Bolsista: Programa Universidade para Todos, PROUNI, Brasil.

**Curso de Pós-Graduação:** Mestrado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2012-2014.

Título: Aplicação de micro-organismos na remediação de águas marinhas contaminadas  
com hidrocarbonetos.

Orientador: Marilene Henning Vainstein.

Bolsista: Bioplus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., BIOPLUS, Brasil.

**Curso de Pós-Graduação:** Doutorado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2014-2018. Com período sanduíche na Universitat de Barcelona (UB) (Supervisão: Magdalena Grifoll).

Título: Associações microbianas com aplicações biotecnológicas para degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Orientador: Marilene Henning Vainstein.

Co-orientador: Fátima Menezes Bento.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

**Public Communication Skills Course.** Carga horária: 8h. Período: 2018-2018. Universitat de Barcelona, UB, Espanha.

**Curso de Bioinformática Básica.** Carga horária: 30h. Período: 2015-2015. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

**Curso Acessando a Diversidade Genômica através do sequenciador de alto desempenho.** Carga horária: 12h. Período: 2014-2014. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

**Curso de Técnicas de Espalhamento de Luz.** Carga horária: 20h. Período: 2012-2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

**Curso de PCR em Tempo Real.** Carga horária: 6h. Período: 2012-2012. Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.

**Curso Teórico-Prático de Biologia Molecular.** Carga horária: 30h. Período: 2012-2012. Fundação Médica do Rio do Sul, FMRS, Brasil.

**Extensão universitária em Nivelamento em Informática.** Carga horária: 60h. Período: 2010-2010. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

**Oficina Universo microscópico do corpo humano.** Carga horária: 20h. Período: 2010-2010. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

**Curso Bioquímica do Diabetes.** Carga horária: 8h. Período: 2009-2009. Universidade de Passo Fundo, UPF, Brasil.

**III Curso de Interpretação de Hemograma.** Carga horária: 8h. Período: 2009-2009. Universidade de Passo Fundo, UPF, Brasil.

**Curso Tratamento de Efluentes.** Carga horária: 8h. Período: 2009-2009. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

**Curso Microbiologia da Água.** Carga horária: 4h. Período: 2009-2009. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

**Curso Interferências Pré Analíticas no Laboratório.** Carga horária: 3h. Período: 2007-2007. Instituto Hermes Pardini, IHP, Brasil.

## **ESTÁGIOS**

**Vínculo: Bolsista de Desenvolvimento Técnico e Industrial – nível III (CNPQ).**

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: 2011-2012.

Atividades: Realização de experimentos laboratoriais relacionados ao projeto desenvolvido: Desenvolvimento de soluções biotecnológicas eficientes e ambientalmente corretas visando redução de custo da produção de biodiesel e melhorias da qualidade no armazenamento.

**Vínculo: Estágio curricular.** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde –

IPB/LACEN – RS. Período: 2010-2011. Atividades: Acompanhamento e realização da rotina laboratorial (microbiologia, micologia, epidemiologia, coletas em geral e controle de qualidade), bem como estudo e discussão de casos clínicos.

**Vínculo: Estágio extracurricular.** Laboratório Sant’anna, Carazinho – RS. Período:

2010-2010. Atividades: Acompanhamento e realização da rotina laboratorial (hematologia, imunologia, bioquímica, urinálise, parasitologia, microbiologia, citologia, coletas em geral e controle de qualidade), bem como estudo e discussão de casos clínicos.

**Vínculo: Monitoria.** Estudos em Microbiologia e Processos Imunológicos. Instituição:

Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Período: 2010- 2010. Atividades: Monitoria com a função de produzir materiais necessários para uso dos alunos do curso de

Biomedicina durante as aulas práticas, realizar o descarte apropriado de materiais utilizados e auxiliar na manutenção e disponibilidade dos produtos de laboratório.  
Responsável: Adriana Becker Pinto.

**Vínculo: Estágio extracurricular.** Laboratório Delta, Carazinho – RS. Período: 2009-2009. Acompanhamento e realização da rotina laboratorial (hematologia, imunologia, bioquímica, urinálise, parasitologia, microbiologia, citologia, coletas em geral e controle de qualidade), bem como estudo e discussão de casos clínicos.

**Vínculo: Monitoria.** Métodos de Análises em Laboratório de Análises Clínicas I. Instituição: Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Período: 2009- 2009. Atividades: Monitoria com a função de produzir materiais necessários para uso dos alunos do curso de Biomedicina durante as aulas práticas, realizar o descarte apropriado de materiais utilizados e auxiliar na manutenção e disponibilidade dos produtos de laboratório.  
Responsável: André Bilibio Westphalen.

**Vínculo: Estágio extracurricular.** Banco de Sangue Oswaldo Cruz – Hospital da Cidade de Passo fundo, Passo Fundo – RS. Período: 2008-2009. Atividades: Acompanhamento e realização da rotina laboratorial e infusão de hemocomponentes.

## ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

PEREIRA, EVANDRO; **NAPP, AMANDA**; BRAUN, JOÃO V.; SEFERIN, MARCUS; AYRES, JEANE; LIGABUE, ROSANE; FONTOURA, LUIZ A.M.; PASSAGLIA, LUCIANE M.P.; VAINSTEIN, MARILENE H. Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine the bovine tallow methyl esters content. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES*, v. 1093, p. 134, 2018.

**NAPP, AMANDA P.**; PEREIRA, JOSÉ EVANDRO S.; OLIVEIRA, JORGE S.; SILVA-PORTELA, RITA C.B.; AGNEZ-SILVA, LUCYMARA F.; PERALBA, MARIA C.R.; BENTO, FÁTIMA M.; PASSAGLIA, LUCIANE M.P.; THOMPSON, CLAUDIA E.; VAINSTEIN, MARILENE H. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. *CHEMOSPHERE*, v. 209, p. 7-16, 2018.

MORO, GLACI V.; ALMEIDA, RAFAELA T.R.; **NAPP, AMANDA P.**; PORTO, CARLA; PILAU, EDUARDO J.; LÜDTKE, DIOGO S.; MORO, ANGÉLICA V.; VAINSTEIN, MARILENE H. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. *Microbial Biotechnology (Online)*, v. 11, p. 759-769, 2018.

BRAUN, JOÃO VITOR; DOS SANTOS, VINÍCIUS OLIVEIRA BATISTA; MAZZINI FONTOURA, LUIZ ANTONIO; PEREIRA, EVANDRO; **NAPP, AMANDA**; SEFERIN, MARCUS; DULLIUS, JEANE ESTELA DE LIMA; LIGABUE, ROSANE; VAINSTEIN, MARILENE HENNING. GC-FID methodology validation for the fatty esters content determination in biodiesel with hexadecyl acetate as the internal standard. QUIMICA NOVA, v. 40, p. 1111-1116, 2017.

ALLEBRANDT, S. R.; **NAPP, A. P.**; SILVEIRA, S. M.; BENTO, F. M.; VAINSTEIN, M. H. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil using native hydrocarbon-degrading bacterial strains under microcosm study. International Journal of Advanced Research, v. 3, p. 732-746, 2015.

## **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

NAPP, A. P.; PEREIRA, J. E. S.; VAINSTEIN, M. H.; JIMÉNEZ-VOLKERINK, S. N.; GRIFOLL, M. Comparative metagenomics reveals different hydrocarbon degradative abilities from enriched oil-drilling waste. In: PhD Day Gen Mic Est. Barcelona. Pôster, 2018.

PEREIRA, J. E. S.; NAPP, A. P.; ALLEBRANDT, S.; PERALBA, M. C.; PASSAGLIA, L.; BENTO, F. M.; VAINSTEIN, M. H. Biorremediação de ambiente marinho por microrganismos autóctones. IV Salão de Iniciação Científica e Tecnológica, I Salão de Pós-Graduação – CIENTEC. Porto Alegre. Resumo, 2017.

NAPP, A. P.; PEREIRA, J. E. S.; ALLEBRANDT, S.; PERALBA, M. C.; PASSAGLIA, L.; BENTO, F. M.; VAINSTEIN, M. H. Associações microbianas com aplicações biotecnológicas para remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos. IV Salão de Iniciação Científica e Tecnológica, I Salão de Pós-Graduação – CIENTEC. Porto Alegre. Resumo, 2017.

NAPP, A. P.; PEREIRA, J. E. S.; ALLEBRANDT, S.; MORO, G. V.; VAINSTEIN, M. H. Microbial associations with biotechnological applications in contaminated environments. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS9. Rio de Janeiro. Pôster, 2016.

PEREIRA, J. E. S.; NAPP, A. P.; ALLEBRANDT, S.; MORO, G. V.; VAINSTEIN, M. H. Optimization of a fractioning method for petroleum hydrocarbons determination. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS9. Rio de Janeiro. Pôster, 2016.

MORO, G. V.; ALLEBRANDT, S.; NAPP, A. P.; PEREIRA, J. E. S.; VAINSTEIN, M. H. Characterization of biosurfactants for biotechnological uses. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS9. Rio de Janeiro. Pôster, 2016.

PEREIRA, EVANDRO; NAPP, AMANDA; BRAUN, JOÃO V.; SEFERIN, MARCUS; AYRES, JEANE; LIGABUE, ROSANE; FONTOURA, LUIZ A.M.; PASSAGLIA, LUCIANE M.P.; VAINSTEIN, MARILENE H. Development and validation of analytical methodology by GC-FID using hexadecyl propanoate as an internal standard to determine



the bovine tallow methyl esters content. 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Natal. Pôster, 2016.

NAPP, A. P.; ALLEBRANDT, S.; VAINSTEIN, M. H. Bioprospection of oil degrading microorganisms for biorremediation. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguaçu. Resumo, 2015.

ARAÚJO, S.; SILVA-PORTELA, R.; ARAÚJO, W.; NAPP, A. P.; AGNEZ-LIMA, L. Isolation of hydrocarbonoclastics bactéria derived from production water. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguaçu. Pôster, 2015.

SILVA-PORTELA, R.; ARAÚJO, S.; VIEIRA, V. K. B.; ARAÚJO, W.; NAPP, A. P.; AGNEZ-LIMA, L. Hydrocarbonoclastic microbial consortia obtained from petroleum-produced water. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguaçu. Pôster, 2015.

NAPP, A. P.; ALLEBRANDT, S.; SALVATI, C.; GOETZE, D.; MITIDIARI, S. S.; VAINSTEIN, M. H. Application of microorganisms in remediation of water contaminated with hydrocarbon. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS8. Porto Alegre. Resumo, 2013.

ALLEBRANDT, S.; NAPP, A. P.; MITIDIARI, S. S.; VAINSTEIN, M. H. Uso de microrganismos para remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS8. Porto Alegre. Pôster, 2013.

ALLEBRANDT, S.; NAPP, A. P.; MITIDIARI, S. S.; VAINSTEIN, M. H. Degradação de hidrocarbonetos por microrganismos em experimento com microcosmos. In: Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium – LABS8. Porto Alegre. Resumo, 2013.

NAPP, A. P.; ALLEBRANDT, S.; VAINSTEIN, M. H. Application of microorganisms in remediation of water contaminated with hydrocarbon. In: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Natal. Pôster, 2013.