



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

RAFAELA OLIVEIRA ARAÚJO

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO
ÓLEO DIESEL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS
POR PETRÓLEO

JOÃO PESSOA

2017

RAFAELA OLIVEIRA ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO
ÓLEO DIESEL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS
POR PETRÓLEO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular do Centro de Ciências
Exatas e da Natureza, da Universidade Federal
da Paraíba como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.**

Orientadora: Dra. Krystyna Gorlach Lira

JOÃO PESSOA

2017

A663p Araújo, Rafaela Oliveira.

Produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias isoladas de ambientes contaminados por petróleo / Rafaela Oliveira Araújo. - João Pessoa, 2017.

66 f.: il. -

Orientadora: Krystyna Gorlach Lira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia Celular e Molecular. 2. Biossurfactantes.
3. Bactérias. 4. Óleo diesel. 5. Microcosmo. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

RAFAELA OLIVEIRA ARAÚJO

Dissertação de Mestrado avaliada em: 08/06/17

BANCA EXAMINADORA

Krystyna Górlach Lira

Prof.^a. Dr.^a. Krystyna Górlach Lira (Orientadora)

Docente Depto. Biologia Molecular/CCEN/UFPB

Ilda A. Salata

Prof.^a. Dr.^a. Ilda Antonieta Salata Toscano (Membro Externo)

Docente Depto. Química/CCEN/UFPB

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior (Membro Interno)

Docente Depto. Biologia Molecular/CCEN/UFPB

Dedico esse trabalho a minha família que tanto amor e apoio sempre me ofertaram incentivando-me a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar o dom da vida, saúde, seu imenso amor, misericórdia e graças.

Aos meus Pais por serem tão presentes em minha vida, pela ajuda, amor e carinho sempre dedicados a mim.

A meu esposo Alexandre, por estar sempre ao meu lado, por seu incentivo, amor e compreensão.

A minha filha Raissa, por ser minha grande fonte de inspiração e felicidade e também por seu amor e compreensão.

A minha orientadora Krystyna Lira, que possibilitou a conclusão desse trabalho, por ser fonte de inspiração, por sua confiança, carinho, paciência, dedicação, incentivo e ensinamentos.

Aos amigos do BIOMICRO, Adriano, Bruno, Dona Alda, Iasmin e especialmente Antônio e Gláucia pelo apoio, incentivo, carinho e auxílio em tantos momentos.

Aos amigos do PPGBCM pelo conhecimento compartilhado, incentivo e apoio.

A secretária da Pós-Graduação, Regina, pela atenção, ajuda, incentivo, carinho dedicação e paciência.

A todos os professores da pós-graduação em Biologia Molecular e Celular que tanto contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Molecular.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

“A força mais potente do universo é a fé”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Vários microrganismos possuem a capacidade de produzir biossurfactantes e de degradar hidrocarbonetos do petróleo, os quais podem ser utilizados em estratégias de biorremediação para recuperação de ambientes poluídos pelo petróleo e seus derivados. No presente trabalho objetivou-se avaliar a produção de biossurfactantes e potencial de degradação do óleo diesel por bactérias, bem como a dinâmica de crescimento de bactérias introduzidas em água do mar e no solo com adição do óleo diesel em condições laboratoriais (experimento microcosmo). A análise filogenética dos isolados foi realizada com base de sequências de RNAr 16S. A capacidade de produção de biossurfactantes foi analisada através dos testes de emulsificação do óleo diesel, hemólise e teste de produção de ramnolipídeos no meio com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e azul de metileno. A presença do gene *rhlAB*, envolvido na síntese de ramnolipídeos e do gene *alkB*, envolvido na degradação de alcanos do óleo diesel foi avaliada pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os experimentos microcosmo foram realizados utilizando solo e água do mar com adição do óleo diesel. Análise filogenética de dez isolados de bactérias revelou que cinco isolados pertenceram ao gênero *Bacillus* e cinco ao gênero *Pseudomonas*. A emulsificação do óleo diesel foi observada em quatro isolados no meio de Bushnell e Haas e no caldo nutriente. Todos os isolados apresentaram atividade hemolítica e oito isolados produziram ramnolipídeos em meio com CTAB e azul de metileno. O gene *rhlAB* foi detectado em quatro isolados, todos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, e gene *alkB* em nove isolados. Os resultados do experimento microcosmo mostraram que os dois isolados de *P. aeruginosa* introduzidos no solo e na água do mar contendo 1% de óleo diesel apresentaram aumento de densidade a partir do quinto dia de incubação indicando que a presença de óleo diesel estimulou o crescimento das bactérias testadas. Os isolados de bactérias analisados neste estudo exibiram potencial de aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo.

Palavras-chave: Biossurfactantes. Bactérias. Óleo diesel. Microcosmo.

PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS AND DEGRADATION OF DIESEL OIL BY BACTERIA ISOLATED FROM ENVIRONMENTS CONTAMINATED BY PETROLEUM

ABSTRACT

Several microorganisms have the capacity to produce biosurfactants and to degrade petroleum hydrocarbons, which can be used in the bioremediation strategies for the recovery of environments polluted by petroleum and its derivatives. The present work aimed to evaluate the potential of biosurfactants production and degradation of diesel oil by bacteria isolates, as well as to evaluate the growth dynamics of bacteria introduced into seawater and soil with addition of diesel oil in laboratory conditions (microcosm experiment). Phylogenetic analysis of the isolates was performed on the basis of 16S rRNA sequences. The biosurfactant production capacity was analyzed by diesel oil emulsification, hemolysis and rhamnolipid production tests on the medium with cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) and methylene blue. The presence of the genes *rhlAB*, involved in the synthesis of rhamnolipids and *alkB*, involved in the degradation of alkanes of diesel oil was evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR). The microcosm experiments were carried out using soil and seawater contaminated by diesel oil. Phylogenetic analysis of ten isolates of bacteria revealed that five isolates belonged to the genus *Bacillus* and five to the genus *Pseudomonas*. Emulsification of diesel oil was observed in four isolates in the Bushnell and Haas medium and in the nutrient broth. All isolates showed hemolytic activity and eight isolates produced rhamnolipids in medium with CTAB and methylene blue. The *rhlAB* gene was detected in four isolates, all belonging to the genus *Pseudomonas*, and the *alkB* gene in nine isolates. The results of the microcosm experiment with two isolates of *P. aeruginosa* introduced into soil and seawater containing 1% of diesel oil showed that their density increased from the fifth day of incubation indicating that the presence of diesel oil stimulated the growth of bacteria tested. The bacterial isolates analyzed in this study showed potential of application in bioremediation processes of environments contaminated by petroleum.

Keywords: Biosurfactants. Bacteria. Diesel oil. Microcosm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais causas de derramamento de óleo no ambiente terrestre	15
Figura 2 –	Hidrocarbonetos do petróleo	17
Figura 3 –	Principais derivados do petróleo	18
Figura 4 –	Processo de degradação aeróbica de hidrocarbonetos do petróleo	19
Figura 5 –	Etapas bioquímicas do processo de biodegradação.....	20
Figura 6 –	Monoramnolipídeos(a) e diramnolipídeos(b).....	25
Figura 7 –	Biossíntese de ramnolipídeos	27
Figura 8 –	Árvore filogenética dos isolados de bactérias e linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise neighbour-joining e o modelo Kimura 2. Os valores de bootstrap mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostrados em parênteses.....	42
Figura 9 –	Emulsificação do óleo diesel por sobrenadante livre de células em caldo nutriente com adição de óleo diesel (CNO) (isolado AG10).	44
Figura 10 –	Atividade hemolítica dos isolados de bactérias. Resultado positivo para os isolados P1R13, P1R14, P1R16 e P1R21.	45
Figura 11 –	Deteção da produção de ramnolipídeos no meio com CTAB-azul de metileno nos isolados de bactérias. Isolados positivos: AG13, AG10 e P1R14; isolado negativo: AG8	46
Figura 12 –	Deteção do gene <i>rhlAB</i> envolvido na produção de ramnolipídeos. Linhas: DNA ladder 100 pb (*), Isolados positivos: P1R14 (1); negativos: AG10 (2), AG11 (3), AG13 (4).	47
Figura 13 –	Deteção do gene <i>alkB</i> em isolados de bactérias. Linhas: DNA ladder 100 pb (1), isolados positivos: AG8 (2), AG10 (3), P1R14 (4).	47
Figura 14 –	Contagens de bactérias (UFC/g de solos seco) dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.....	49
Figura 15 –	Contagens de bactérias dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidas na água do mar com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Identificação dos isolados de bactérias com base nas análises do BLAST das sequencias do RNAr 16S.....	41
Tabela 2 –	Índices de emulsificação de óleo diesel por bactérias cultivadas no meio Bushnell e Haas contendo óleo diesel (BHO) e extrato de levedura e no meio caldo nutriente contendo óleo diesel (CNO)	43
Tabela 3 –	Atividade hemolítica dos isolados de bactérias.....	44
Tabela 4 –	Produção de ramnolipídeos em meio contendo brometo cetiltrimetilamônio e azul de metileno	46
Tabela 5 –	Contagens de bactérias (UFC/g de solos seco) dos isolados P1R16 e P1R42 (em duplicata A e B) introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.....	49
Tabela 6 –	Contagens de bactérias (UFC/ml de água do mar) dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos na água com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais classes de biossurfactantes	24
Quadro 2 – Microrganismos produtores de biossurfactantes	28
Quadro 3 – Principais usos comerciais dos biossurfactantes	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>AlkB</i>	Alcano monoxigenase
<i>AlkF</i>	Rubredoxina
<i>AlkG</i>	Rubredoxina redutase
<i>AlkT</i>	Rubredoxina redutase
BHO	Bushnell e Haas acrescido de óleo diesel
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CLC	Convenção sobre a Responsabilidade Civil
CMC	Concentração micelar crítica
CNO	Caldo nutriente acrescido de óleo diesel
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DPC	Diretoria e Portos e Costas
Dtdp	Desoxi-timidina-difosfo-L-raminose
HAA	3-(3-hidroxi- <i>alcanoil</i> oxi)- <i>alcanoato</i>
MARPOL	Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
HPA	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
RhlA	Ramnosiltransferase
<i>RhlB</i>	Ramnosiltransferase I
<i>RhlC</i>	Ramnosiltransferase II
RNA _r	RNA ribossômico
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	O PETRÓLEO E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	15
1.2	BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO.....	19
1.3	BIOSSURFACTANTES	23
1.3.1	Aspectos Gerais dos Biossurfactantes	23
1.4	MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES	26
1.4.1	Ramnolipídeos e sua Síntese.....	26
1.4.2	Fatores que Influenciam a Produção de Biossurfactantes	29
1.4.3	Aplicação dos biossurfactantes	31
1.5	BIORREMEDIAÇÃO DOS AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO	32
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	ISOLADOS DE BACTÉRIAS	35
3.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS	35
3.2.1	Extração e Amplificação do DNA Bacteriano.....	35
3.2.2	Sequenciamento do Gene de RNAr 16S e Construção da Árvore Filogenética.....	36
3.3	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR ISOLADOS DE BACTÉRIAS ...	36
3.3.1	Teste de Emulsificação	36
3.3.2	Atividade Hemolítica.....	37
3.3.3	Produção de Ramnolipídeos	37
3.4	DETECÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS E NA DEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO	38
3.4.1	Extração de DNA.....	38
3.4.2	Detecção do Gene Envolvido da Produção de Ramnolipídeos.....	38
3.4.3	Detecção do Gene Envolvido na Biodegradação de Hidrocarbonetos	38
3.5	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL NO EXPERIMENTO MICROCOSMO	39
3.6	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA DO MAR CONTAMINADA COM ÓLEO DIESEL NO EXPERIMENTO MICROCOSMO .	40

3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS	42
4.2	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	44
4.3	PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS E PRESENÇA DO GENE <i>rhlAB</i>	46
4.4	PRESENÇA DO GENE <i>alkB</i> ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	48
4.5	CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTRODUZIDAS NO SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL (MICROCOSMO).....	49
4.6	CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTRODUZIDAS NA ÁGUA DO MAR CONTAMINADA COM ÓLEO DIESEL (MICROCOSMO).....	50
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PETRÓLEO E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

O petróleo é um resíduo fóssil formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, sua composição difere em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram. O petróleo é um composto oleoso, inflamável, menos denso que a água, com cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010). Atualmente é o petróleo uma das principais fontes energéticas no Brasil, com grande importância econômica, estima-se que 37,3% da energia consumida no Brasil seja proveniente do petróleo e de seus derivados (BRASIL, 2014). Mundialmente o consumo de petróleo corresponde a 32,9% do consumo energético mundial sendo a América do Norte e a Europa os maiores consumidores (BRITISH PETROLEUM, 2014). Apesar da grande importância dessa fonte de energia a mesma tem sido motivo de grande preocupação mundial já que contaminações ambientais ocasionadas principalmente por acidentes com consequente derramamento de petróleo e seus derivados são responsáveis por causar danos ao meio ambiente e a saúde humana. Os acidentes ambientais envolvendo o petróleo e seus derivados não são de ocorrência rara e têm grande potencial desastroso do ponto de vista ambiental, tais acidentes podem ser provenientes de inúmeras causas e podem ocorrer durante a exploração, o refino, o transporte ou armazenamento do petróleo e seus derivados.

Os hidrocarbonetos de petróleo são considerados os contaminantes principais do meio ambiente (MEDAURA; ÉRCOLI, 2008; PASSOS et al., 2009; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011; SILVA et al., 2015), tal contaminação ocasiona invariavelmente grandes prejuízos aos seres vivos expostos a tais produtos e consequentemente desequilíbrio ambiental, contaminação de ambientes terrestres, marinhos além de águas subterrâneas e ar atmosférico (SOUZA; PERES; MORAES, 2008).

Há evidências de que os hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados são capazes de causar câncer em peixes e moluscos, e podem ser tóxicos e potencialmente carcinogênicos ao homem (VUORINEN et al., 2006). Os efeitos tóxicos do petróleo e seus derivados podem afetar o crescimento, a reprodução, a respiração e o comportamento das espécies existentes em locais contaminados por petróleo, com consequente redução da biodiversidade (VUORINEN et al., 2006).

A Figura 1 mostra os principais eventos que ocasionam derramamentos de óleos que ocorrem em ambientes terrestres, porém muitos acidentes afetam também os ambientes

marinhos e refletem-se diretamente sobre os ecossistemas costeiros próximos ao local do acidente evidenciando assim a urgência em minimizar os efeitos causados por esse tipo de contaminação.

Figura 1 – Principais causas de derramamento de óleo no ambiente terrestre.



Fonte: Frena (2011).

Por diversos anos, principalmente em 1980 os acidentes envolvendo o derramamento de petróleo eram muito comuns, e responsáveis por grandes prejuízos para o meio ambiente e para a economia, visando minimizar esses acidentes foram criadas medidas como leis e decretos, no Brasil atualmente vigoram legislações especiais que visam a diminuição desses acidentes, como a Prevenção da poluição origem terrestre: Portaria do Ministério dos Transportes Nº 124/80; a Política Nacional de Meio Ambiente: Lei Federal Nº 6.938/81, e a Lei de Segurança do Tráfego Aquaviário (LESTA): Lei Federal Nº 9.537/97.

Entre os países também existem convenções internacionais que buscam a diminuição dos acidentes como a CLC 69 – Convenção Internacional sobre a Responsabilidade Civil de Danos Causados por Poluição por Óleo: Dec. Federal Nº 83.540/79; a ISM Code – Código Segurança Marítima – Portaria Nº 046/96 da Diretoria e Portos e Costas (DPC) do Ministério da Marinha; e a MARPOL 73/78 – “Marine Pollution” – Convenção internacional para prevenção da poluição causada por navios: Dec. Executivo Nº 2.508/98.

Muitos eventos de acidentes envolvendo o petróleo e seus derivados são relatados, pequenos e médios vazamentos correspondem a 95% de todos os incidentes registrados, dentre os quais, 40% e 29% corresponde, respectivamente, a ocorrências durante operações de carga e descarga que normalmente acontecem em portos e terminais de óleo (ITOPF, 2015).

Os relatórios da base de dados The International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF, 2015) indicam que vazamentos superiores a 700 t de petróleo, são

responsáveis por 5% dos eventos registrados, como exemplo de acidente de grandes proporções tem-se o ocorrido em 1989 com o petroleiro Exxon Valdez que encalhou no Alasca derramando uma estimativa 11 milhões de galões (42 milhões de litros) de petróleo bruto que se espalhou rapidamente devido a correntes de maré e ventos (ATLAS, 1995).

No ano de 2010 ocorreu o desastre ocasionado pela explosão da plataforma da Deepwater Horizon (British Petroleum) no Golfo do México, esse acidente resultou no vazamento de mais de 779 milhões de litros de petróleo, a cerca de 1,6 Km de profundidade, gerou uma mancha de óleo que contaminou cerca de 6.500 Km² e poluiu as regiões litorâneas de seis estados norte-americanos (ATLAS e HAZEN, 2011), nesse acidente 11 funcionários perderam a vida.

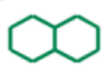
No Brasil ocorreu, entre outros, o vazamento de três milhões de litros em Bertioga – SP em 1983, 2,8 milhões de litros nos manguezais da Baía de Guanabara em 1997 (CETESB, 2007), em janeiro de 2000, novamente na Baía de Guanabara um rompimento do oleoduto resultou no vazamento de cerca de 1,300 milhões de litros de óleo e em uma mancha que se espalhou por 40 Km² (AMBIENTES BRASIL, 2016), no mesmo ano no Paraná 4 milhões de litros forma derramados nos rios rio Barigui e Iguaçu (CETESB, 2007). Em março de 2001, na Bacia de Campos em Macaé, Rio de Janeiro um acidente ocorrido em uma plataforma resultou no vazamento de 1,2 milhão de litros de óleo diesel e 350 mil litros de petróleo para o oceano (ANP, 2016). Em 2011 ocorreu o vazamento de 588 mil litros de óleo no mar, na Bacia de Campos, Rio de Janeiro e resultou em uma mancha de óleo com 18 quilômetros de extensão (CABRAL; TEIXEIRA, 2012).

Devido, portanto, à grande importância mundial dessa fonte de energia proveniente do petróleo e da ocorrência desastrosa de acidentes envolvendo principalmente o derramamento ou vazamento de óleo, em ambientes terrestres ou aquáticos, esforços têm sido feitos com o intuito de encontrar alternativas eficazes para recuperação dos ambientes afetados.

O petróleo quimicamente é uma combinação complexa de hidrocarbonetos contendo aproximadamente 82% de carbono e 12% de hidrogênio, podendo conter também quantidades pequenas de nitrogênio (aproximadamente 4%), oxigênio (1%), compostos de enxofre, íons metálicos (0,5%), algumas amostras podem conter também cerca de 5% de sais (ANP, 2016).

Na Figura 2 são mostrados exemplos de hidrocarbonetos presentes no petróleo e suas respectivas estruturas químicas. (FRENA 2011).

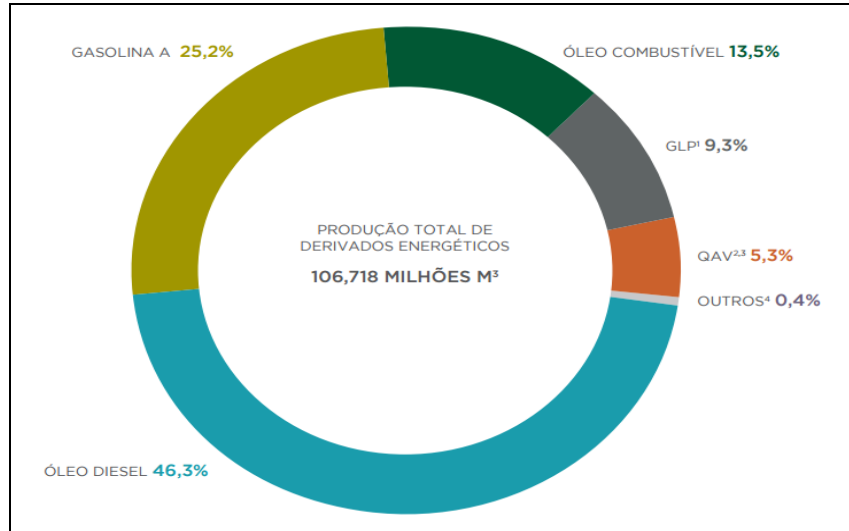
Figura 2 – Alguns hidrocarbonetos do petróleo.

Grupos	Sub-grupos	Exemplos
Saturados	Alcanos	Butano 
		Hexano 
	Ciclo alcanos	Ciclo hexano 
		Tetrahidronaftaleno 
	Ceras	Alcanos de cadeia longa
Aromáticos	BTEX	Benzeno 
		Tolueno 
	PAH	Naftaleno 
		Fenantreno 
Componentes polares	Resinas	Tióis -SH
		Decanomercaptano  SH
	Asfaltenos	Estruturas não conhecidas com grande quantidade de compostos polares

Fonte: Frena (2011).

Os produtos derivados do petróleo consistem principalmente em óleo diesel (46,3%), gasolina (25,2%), óleo combustível (13,5%), produtos não energéticos (16%), gás (9,3%) e outros produtos energéticos (5,7%) como é possível observar no gráfico da Figura 3. O óleo diesel contém de 08 a 16 carbonos, é um combustível usado principalmente em transporte rodoviário e aquaviário, em motores do ciclo diesel, além de ser utilizado também em termoelétricas e para aquecimento (ANP, 2016).

Figura 3 - Principais derivados do petróleo.



Fonte: ANP (2016).

Os componentes do óleo diesel são hidrocarbonetos de cadeias simples, não ramificadas, olefinas e com pequenas concentrações de componentes policíclicos aromáticos (BAKER; HERSON, 1994). O óleo diesel tem como características ser um composto líquido, viscoso, inflamável, extremamente insolúvel, com odor característico e meia vida considerada persistente. Em caso de derramamento esse combustível não pode ser removido sem que haja uma efetiva intervenção de limpeza, pois, podem permanecer nos costões, estruturas, sedimentos de praias ou manguezais, entre outros locais, de seis a sete dias, até vários anos, dependendo da quantidade de volume vazado.

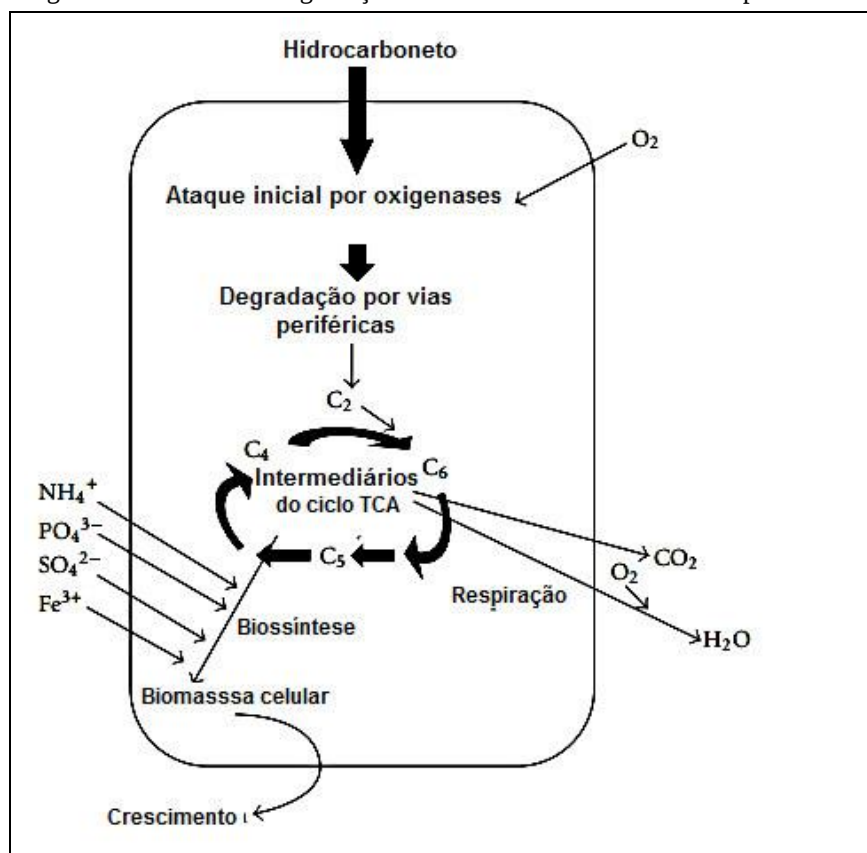
1.2 BIODGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Vários microrganismos possuem capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos provenientes do petróleo e usá-los como fonte de carbono e energia para o crescimento (THAPA; AJAY KUMAR; GHIMIRE, 2012). A maioria dos microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos é anaeróbica, porém alguns microrganismos com essa capacidade são aeróbios e utilizam os hidrocarbonetos como fonte de carbono para o seu metabolismo. Com essa ação auxiliam o processo de recuperação de áreas que foram contaminadas pelo petróleo ou seus derivados. As bactérias anaeróbicas usam aceptores de elétrons como nitrato, ferro ou sulfato, mas o rendimento energético para essas bactérias é menor que o oxigênio usado comoceptor de elétrons por bactérias aeróbicas. A degradação realizada por microrganismos aeróbicos é mais rápida, pois, tem a vantagem metabólica de

contar com o oxigênio (O_2) comoceptor de elétrons (MELO; AZEVEDO, 2008; CAO et al., 2012).

A Figura 4 mostra as etapas do processo de degradação aeróbica de hidrocarbonetos de petróleo, que inicialmente depende de reações enzimáticas de ativação e incorporação de oxigênio, catalisadas por oxigenases, ocorrem reações de degradação por vias periféricas que convertem o material orgânico em compostos intermediários por várias vias metabólicas (MONTAGNOLLI; LOPES; BIDOIA, 2015).

Figura 4 – Processo de degradação aeróbica de hidrocarbonetos do petróleo.



Fonte: Das e Chandran (2011).

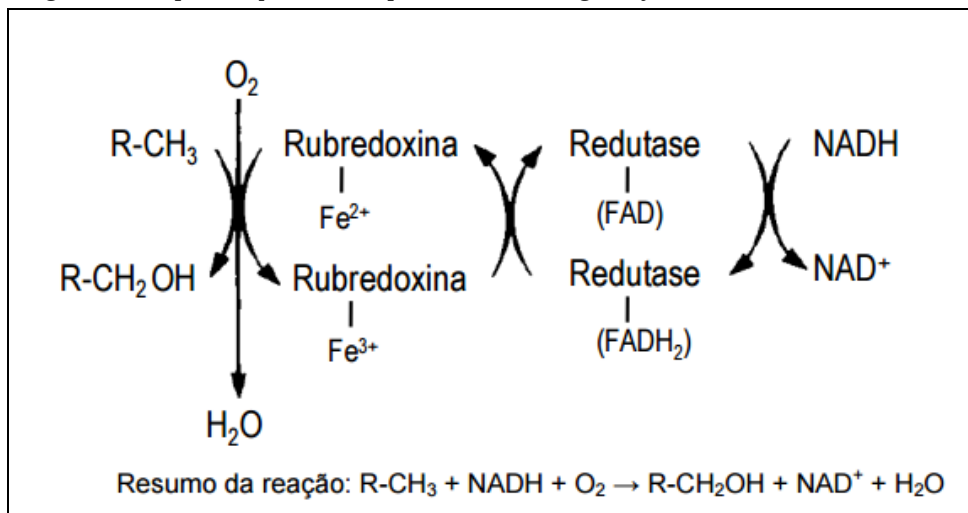
O menor rendimento energético por bactérias anaeróbicas resulta em menor degradação e, portanto, é necessário um período de tempo mais longo para a degradação (THAPA; AJAY KUMAR; GHIMIRE, 2012).

A via mais conhecida de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo envolve três principais enzimas que são: alcano hidroxilase (*alkB*), rubredoxina (*alkG*) e rubredoxina redutase (*alkT*) (OLIVEIRA et al., 2012; LUO et al., 2014).

No processo de biodegradação por essas enzimas inicialmente a enzima *alkT* transfere elétrons do cofator NADH para a *alkG* e esse elétron é transferido para a enzima *alkB* que

catalisa a oxidação do alcano com um átomo de oxigênio derivado de uma molécula de oxigênio molecular (O_2). O alcano é convertido em um álcool e a segunda molécula de oxigênio reduzida a H_2O através dos elétrons transferidos do NADH pelas enzimas *alkG* e *alkT* (Figura 5) (ROJO, 2009). A *alkB* é portanto uma proteína que potencializa a reação de hidroxilação, essa enzima é codificada pelo gene *alkB* (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 5 – Etapas bioquímicas do processo de biodegradação.



Fonte: Rojo (2009).

O enzima *alkB* já foi detectado em diversos microrganismos provenientes de ambientes contaminados por derivados de petróleo, sendo que no gênero *Pseudomonas* esse gene é comumente encontrado (SMITS et al., 2002). Muitos microrganismos contêm vários conjuntos de sistemas de biodegradação de alcanos, sendo cada um deles ativo para um tipo específico de alcano ou sendo expressos em condições fisiológicas específicas (ROJO, 2009; AUSTIN; GROVES, 2011). A expressão dos genes da via de degradação de alcanos é frequentemente regulada por complexos que asseguram que os genes serão expressos apenas nas condições apropriadas ou na ausência de outros compostos preferidos (ROJO, 2009).

As populações de microrganismos que possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos normalmente constituem menos de 1% do total da comunidade microbiana, no entanto, quando poluentes estão presentes a população desses microrganismos com capacidade de degradação aumenta para em torno de 10% da comunidade (ATLAS, 1995). A eficiência do processo de degradação depende de muitos fatores físicos, químicos e biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, bem como a estrutura molecular do poluente e sua concentração (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010; RODRIGUES, 2014).

A nutrição também é um fator determinante na degradação do petróleo e seus derivados, os microrganismos com capacidade de biodegradação requerem fontes suficientes de carbono, nitrogênio, fósforo além de microelementos (enxofre, ferro, magnésio, cálcio, sódio e outros) (ATLAS, 1995).

A biodegradação do óleo por ser bioquimicamente complexa é otimizada com a ação de consórcios microbianos que se constituem em populações heterogêneas de bactérias com metabolismos variados. O consórcio tem sido amplamente utilizados, pois são mais eficazes do que as culturas puras, já que permitem a ocorrência da co-metabolização em que alguns microrganismos se encarregam do ataque inicial aos constituintes da fonte oleosa, produzindo compostos intermediários que são, subsequentemente, assimilados por outras espécies microbianas (WASZAK et al., 2015). Muitas bactérias podem degradar os produtos petrolíferos como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Mycobacteria*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Cyanobacteria* e outras (THAPA; AJAY KUMAR; GHIMERE, 2012).

As taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados dependem de vários fatores como, densidade do óleo e concentração dos hidrocarbonetos, sua dispersão e emulsificação, número de microrganismos presentes ou quantidade de enzimas específicas que podem aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante. Quanto maior o número de anéis, maior é a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tornando-o menos susceptível à biodegradação (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010).

Moléculas que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados ou ramificações são mais difíceis de serem degradadas e uma menor variedade de microrganismos possui capacidade de degradar esses hidrocarbonetos (WILSON e JONES, 1993; RODRIGUES, 2014).

Hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno e xileno são compostos por anéis benzênicos, dotados de seis átomos de carbono ligados entre si por valências simples e duplas alternadas, são relativamente solúveis em água e altamente tóxicos, podem ser degradados com facilidade por microrganismos ambientais (CURY, 2002; RODRIGUES, 2014).

Uma entre as estratégias de estudos que pode ser utilizada para verificar o potencial de degradação de hidrocarbonetos é a técnica de microcosmo. Microcosmos são experimentos feitos em laboratório que tem como objetivo reproduzir as condições reais encontradas na natureza (BISINOTI; JARDIM, 2003).

Os testes com microcosmos incluem tratamentos estéreis como controle para separar os efeitos abióticos da perda de hidrocarbonetos da biodegradação real (LIMA et al., 2011). Embora os microcosmos não representem a complexidade presente na natureza em sua totalidade, são ferramentas efetivas, rápidas e relativamente econômicas para a amostragem e identificação do efeito que compostos químicos venham a ter na natureza (KIRK; DYER; NOE, 1991). Resultados bem próximos do meio ambiente real são esperados com a utilização de microcosmos (SINGH, 2006).

Para realização de estudos com a técnica de microcosmo deve-se levar em conta fatores ambientais que afetem a utilização de hidrocarbonetos do petróleo pelos microrganismos como a disponibilidade adequada de água, a concentração de oxigênio dissolvido, os tipos de solo, entre outros (WETLER-TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2014). A partir dessa técnica é possível realizar a análise dinâmica de bactérias ativas na degradação de hidrocarbonetos. Os testes com microcosmos utilizados para avaliar o potencial de biodegradação também podem ser usados no desenvolvimento de modelos para prever o destino de hidrocarbonetos (SINGH, 2006). Entre as vantagens da utilização desse método está o fato de que a taxa de degradação e produtos metabólicos produzidos podem ser monitorados (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010).

1.3 BIOSSURFACTANTES

1.3.1 Aspectos Gerais dos Biossurfactantes

Surfactantes são importantes produtos químicos utilizados pela indústria em vários setores, consistem-se em moléculas anfipáticas, estáveis que tem tanto porções hidrofílicas quanto porções hidrofóbicas, tem a capacidade de diminuir a tensão superficial e uma alta capacidade de emulsificação. A emulsificação é a capacidade de promover a dispersão de um líquido em outro, formando emulsões.

A grande maioria dos surfactantes são derivados do petróleo, não são biodegradáveis, afetam as propriedades físico-químicas e biológicas dos solos e são potencialmente tóxicos ao meio ambiente (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010). Os surfactantes sintéticos são usados principalmente em produtos de limpeza, como detergentes e sabões em pó, e em diversos produtos de higiene pessoal e cosméticos. O dodecil sulfato de sódio (SDS) juntamente com o Triton X-100 são os surfactantes sintéticos mais comumente utilizados na atualidade. O SDS um surfactante iônico composto por 12 átomos de carbono, ligados a um

grupo sulfato, o Triton X-100 um surfactante não iônico derivado de polioxietileno que contém um grupo alquilfenil hidrofóbico (CHAPRÃO et al., 2015).

Os biossurfactantes são surfactantes de origem biológica, produzidos por microrganismos, que consistem em um grupo de moléculas anfipáticas formadas como metabólitos secundários, com estrutura química diversificada e desempenham papéis essenciais à sobrevivência dos microrganismos que os produzem (GUDINÃ et al., 2013). Estes compostos apresentam as mesmas características dos surfactantes sintéticos, e possuem vantagens sobre o uso de surfactantes de origem petroquímica, tais como (HASSAN et al., 2016):

- a) Biodegradabilidade,
- b) Estabilidade,
- c) Baixa toxicidade,
- d) Eficácia de atuação em condições extremas de pH, temperatura e salinidade;
- e) Possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo como substratos renováveis, e
- f) Uso em biorremediação.

Os biossurfactantes, são classificados de acordo com sua natureza bioquímica e podem ser classificados em glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (KAPADIA; YAGANIK, 2013). Os glicolipídios são os mais conhecidos, por serem produzidos por uma ampla variedade de microrganismos. Um mesmo microrganismo pode ser capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídios dependendo da fonte de carbono disponível (PACHECO et al., 2010).

Os trehalolipídios são glicolipídios formados pela ligação de duas moléculas de ácido-hidroxicarboxílico de cadeia longa a uma molécula de trealose. Os sofrorolipídios também são glicolipídios formados por cadeia longa de ácido graxo ligado a molécula de sofrorose e os ramnolipídeos apresentam em sua estrutura ramnose e ácido β -hidroxidecanóico.

Os lipopeptídios são sintetizados principalmente por bactérias, porém muitas espécies de leveduras também têm sido descritas como produtoras desse tipo de biossurfactantes, a surfactina é o lipopeptídio mais conhecido principalmente devido ao seu amplo poder de redução da tensão superficial (REIS; SERVULO; FRANÇA, 2004).

Os ácidos graxos e os fosfolipídios são compostos naturalmente produzidos pelos microrganismos, muitos microrganismos quando cultivados em meio rico em hidrocarbonetos tendem a aumentar a produção destes compostos. Os ácidos graxos e os fosfolipídios exibem muitas vezes propriedades tensoativas de biossurfactantes (DENSAI; BANAT, 1999).

Os biossurfactantes poliméricos são bioemulsificantes, moléculas que apresentam alta afinidade por interfaces óleo/água, e facilitam assim a formação de emulsões estáveis (KOSARIC et al., 1987). No Quadro 1 são mostradas as principais classes de biossurfactantes e exemplos de microrganismos envolvidos em sua biossíntese.

Quadro 1 – Principais classes de biossurfactantes.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
• Ramnolipídios • Soforolopídios • Trehalolipídios	– <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – <i>Torulopsis bombicola</i>, <i>Torulopsis apícola</i> – <i>Rhodococcus erythropolis</i> – <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídios e lipoproteínas	
• Peptídio-lipídio • Viscosina • Serrawetina • Surfactina • Subtilisina • Gramicidina • Polimixina	– <i>Bacillus licheniformis</i> – <i>Pseudomonas fluorescens</i> – <i>Serratia marcescens</i> – <i>Bacillus subtilis</i> – <i>Bacillus subtilis</i> – <i>Bacillus brevis</i> – <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
• Ácidos graxos • Lipídios neutros • Fosfolipídios	– <i>Corynebacterium lepus</i> – <i>Nocardia erythropolis</i> – <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
• Emulsan • Biodispersan • Liposan • Carboidrato-lipídio-proteína • Manana-lipídio-proteína	– <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Candida lipolytica</i> – <i>Pseudomonas fluorescens</i> – <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
• Vesículas • Células	– <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – Várias bactérias

Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

Apesar de ter grande potencial de aplicabilidade em diversos setores, os biossurfactantes incluindo-se os ramnolipídeos possuem elevado custo de produção o que restringe seu uso industrial (MAGALHÃES, 2012). Porém a utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo tais como subproduto agrícola ou de processamento industrial pode reduzir o problema econômico da produção de biossurfactantes. Além de contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados (LOVAGLIO et al., 2014).

1.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

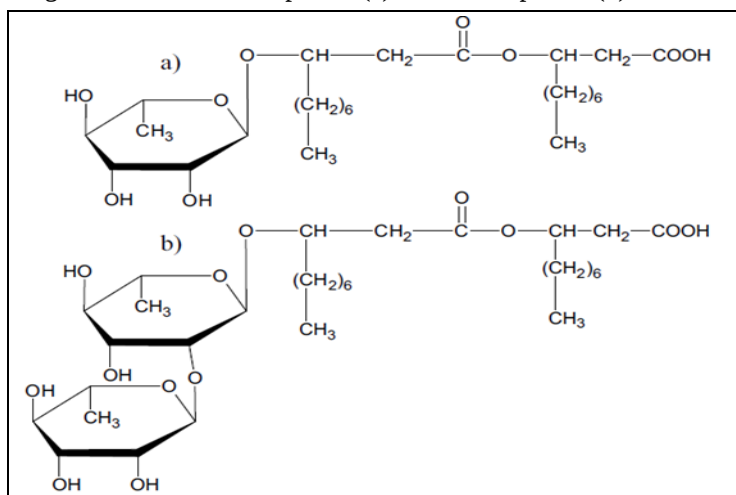
1.4.1 Ramnolipídeos e sua Síntese

Os ramnolipídeos são os biossurfactantes classificados como glicolipídios aniônicos; contém uma ou duas moléculas de ramnose na porção hidrofílica e ácidos β -hidroxialcanóicos na porção hidrofóbica (CECCATO, 2013; MULLIGAN, 2009), estes compostos são capazes de reduzir a tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m e apresentam concentração micelar crítica (CMC) de 10-200 mg/l (MONTEIRO et al., 2007).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais produtoras desse tipo de biossurfactantes, capazes de utilizar diferentes compostos orgânicos simples ou complexos, como glicerol, manitol, frutose, glicose, parafinas, e óleos vegetais, para produzir ramnolipídeos (ABOUSEOUD et al., 2008). Bactérias pertencentes a esse gênero são altamente diversas, com capacidade biosintética versátil, capazes de colonizar um grande número de nichos, sendo encontradas em ambientes terrestres e marinhos, assim como em interações com animais e plantas (WASZAK et al., 2015).

Os principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* são os monoramnolipídios e os diramnolipídios (BANAT, 2010; ABDEL-MAWGOUD et al., 2010), que tem sua estrutura mostrada na Figura 6.

Figura 6 – Monoramnolipídeos (a) e diramnolipídeos (b).



Fonte: Banat et al. (2010).

Os ramnolipídeos estão entre os biossurfactantes mais estudados, amplamente produzidos por uma grande diversidade de microrganismos. Estes compostos foram isolados pela primeira vez por Bergström et al. (1946) de *Pseudomonas pyocyanea* (agora nomeada de *P. aeruginosa*) após crescimento em meio com glicose. A estrutura química dos compostos produzidos foi desvendada por Jarvis e Johnson (1949), e logo em seguida por Edwards e Hayashi (1965), desde então outros diversos tipos de bactérias foram descritos como produtoras desse biossurfactantes.

A *P. aeruginosa* constitui a principal espécie bacteriana produtora de ramnolipídeos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2007; HENKEL et al., 2012). É uma espécie aeróbia que frequentemente habita ambientes terrestres e aquáticos, além de vegetais, faz parte da microbiota normal do ser humano e no meio ambiente pode desempenhar funções de biodegradação de compostos naturais e xenobióticos, além de atuar como promotor de crescimento de plantas (JURELEVECIUS et al., 2013).

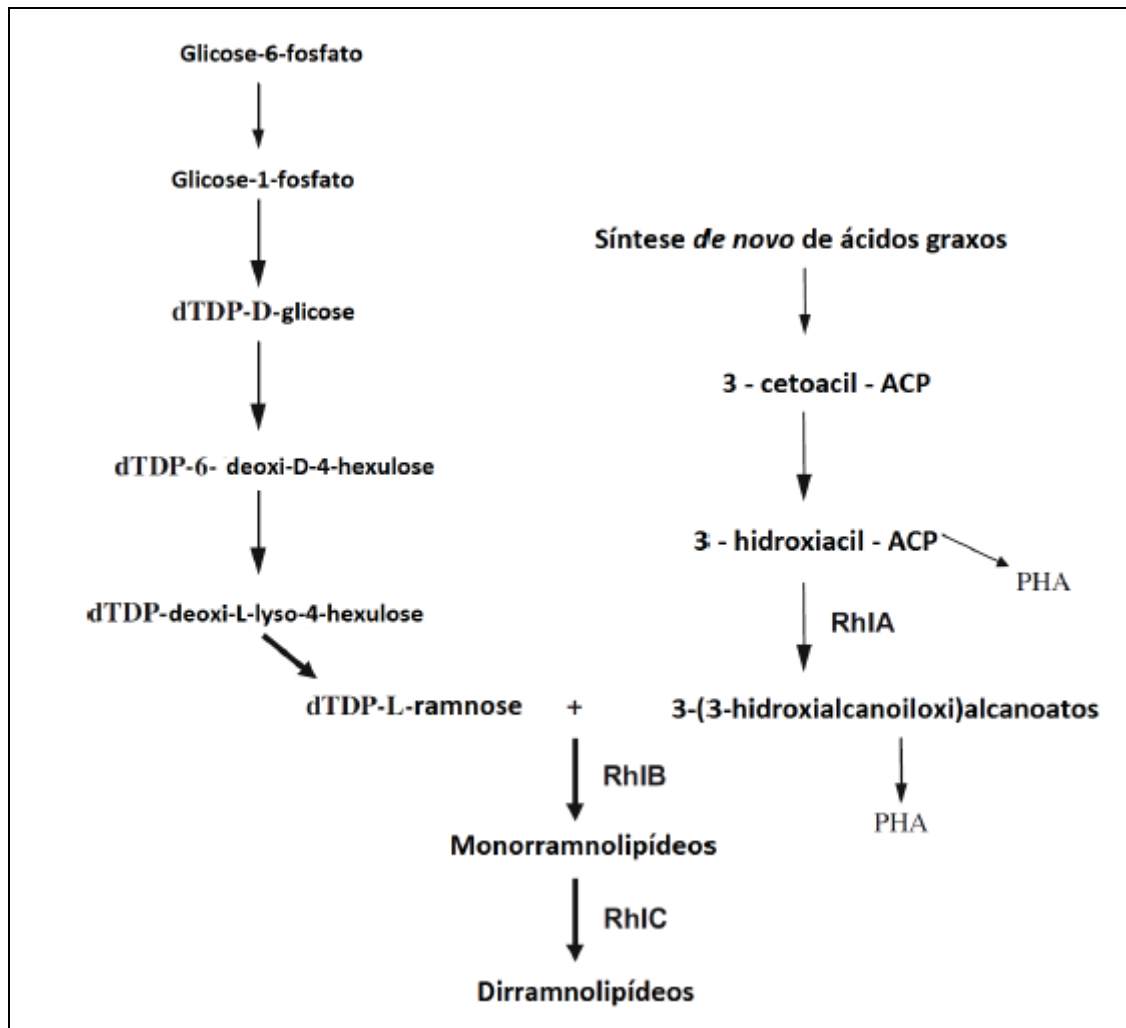
Os ramnolipídeos além de sua capacidade de emulsificação apresentam baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e são importantes para a indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica especialmente por apresentar atividade anti-microbiana e anti-adesiva (MAGALHÃES, 2012).

Os ramnolipídeos podem ser produzidos utilizando-se grande diversidade de substratos renováveis ou resíduos industriais, os ramnolipídeos também apresentam boa estabilidade quando comparados aos surfactantes de origem petroquímica que são mais comumente utilizados.

A biossíntese de ramnolipídeos envolve um complexo de genes, sendo os genes *rhlA* e *rhlB* amplamente descritos em diversos trabalhos como os de Bazire et al. (2005) e Déziel et. al. (2002).

A produção de ramnolipídeos ocorre em três reações sequenciais e está esquematizada na Figura 7, inicialmente a enzima RhlA catalisa a formação de uma ligação éster entre os intermediários de ácidos graxos, 3-hidroxiacil-ACP, formando 3-(3-hidroxiacanoiloxi)-alcanoato (HAA), que é um componente lipídico dos ramnolipídeos. Em seguida a ramnotransferase I (RhlB) catalisa a formação de monoramnolipídeo utilizando como precursor (dTDP)-L-ramnose e HAA unindo-os por uma ligação O-glicosídica, a ação de RhlC adiciona mais um grupo manosil, utilizando como precursor outro (dTDP)-L-ramnose, formando o dirramnolipídeo (EDWARDS; HAYASHI, 1965; RAHIM et al., 2001; DÉZIEL et al., 2003).

Figura 7 – Biossíntese de ramnolipídeos.



Fonte: Adaptada de Soberón-Cháves, Lépine e Déziel (2005).

Os genes *rhlA* e *rhlB* se encontram em um mesmo operon em *P. aeruginosa*, já o gene *rhlC* se encontra em outra posição juntamente com outro gene de função ainda desconhecida (RAHIM et al., 2001; ABDEL-MAWGOUD; LÉPENE; DÉZIEL, 2010). A via de produção dos ramnolipídeos está relacionada à produção de polihidroxi-alcenoatos, os PHA os quais são utilizados como reserva energética por diversas bactérias (COSTA et al., 2009).

Os microrganismos que possuem capacidade de produzir biossurfactantes, são selecionados para pesquisa frequentemente através de capacidades apresentadas em relação à redução da tensão superficial (YOUSSEF et al., 2004; SILVA et al., 2015).

Existe uma enorme variedade de espécies bacterianas relatadas como sendo capazes de produzir biossurfactantes principalmente as pertencentes aos gêneros: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (ALMEIDA, 2012). Os biossurfactantes produzidos são avaliados quanto a sua eficiência considerando-se principalmente as taxas de emulsificação, de

redução da de dispersão, além da atividade hemolítica e da concentração micelar crítica (DENSAI; BANAT, 1999).

Os biossurfactantes são produzidos de forma intracelular ou extracelular e podem ser liberados no meio de cultura ou ficarem aderidos à célula do microrganismo (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

O Quadro 2 mostra algumas bactérias já descritas como produtoras de biossurfactantes.

Quadro 2 – Microrganismos produtores de biossurfactantes.

Microrganismos	Biossurfactante produzido
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Surfactina /Iturina/Fengycin
<i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Arthobacter</i> sp. <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium</i> spp.	Trealolipídeo
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan
<i>C. bombicola</i> <i>C. apícola</i> <i>C. lipolytica</i> <i>Torulopsis candida</i> <i>T. bombicola</i> <i>T. petrophilium</i>	Soforolipídeo
<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolipídeos

Fonte: Adaptado de Desai e Banat (1997), Mulligan (2009), Nitschke, Costa e Contreiro (2007).

1.4.2 Fatores que Influenciam a Produção de Biossurfactantes

A produção de biossurfactantes ocorre em condições favoráveis de temperatura, pH, aeração e nutrientes, sendo que a presença de hidrocarbonetos ou de outros substratos insolúveis é o geralmente induz a formação desses compostos:

- a) pH: O pH é fator que influencia o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários. Estudos de Al-Araji, Basri e Salleh (2007) indicam aumento da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* quando pH é mantido entre a faixa de 7,0 - 7,15.
- b) Temperatura e umidade: A temperatura pode favorecer o aumento ou decréscimo da síntese de biossurfactantes em estudos de George e Jayachandran (2013) a temperatura considerada ótima para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa*, foi de 37 °C, umidade é também fator que exerce forte influência sobre

as atividades microbianas que necessitam de disponibilidade adequada de água (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010).

- c) Agitação e a aeração constituem importantes fatores na produção de biossurfactantes (SANTOS et al., 2010), ambas quando elevadas tendem a aumentar a produção por facilitar a transferência de oxigênio no meio (AQUARONE, 2001). Estes fatores também são importantes por solubilizar substratos insolúveis em água e consequentemente melhorar a absorção de nutrientes no meio para os microrganismos (RAMKRISHNA, 2010).
- d) Nutrientes: a disponibilidade de nutrientes inorgânicos é determinante para a atividade dos microrganismos, ferro, enxofre, nitrogênio e fósforo são nutrientes que podem influenciar na biodegradação e produção de biossurfactantes, pois, desempenham funções celulares relacionadas ao metabolismo dos microrganismos (JACQUE et al., 2007; TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010). Em relação ao fornecimento de nitrogênio, as fontes podem ser diversas, tais como, ureia, nitrato e sais de amônio, bem como aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glicina (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS et al., 2010). Souza et al. (2014) afirma que o nitrato de amônio (NH_4NO_3) pode ser utilizado como excelente fonte de nitrogênio inorgânico. Os hidrocarbonetos presentes nos derivados do petróleo podem ser utilizados como fonte de carbono por diversos microrganismos (SOUZA et al., 2004).
- e) Outros fatores: A ação dos microrganismos é dependente de fatores como o tipo de solo, biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes, a densidade da população de microrganismos e o seu potencial de biodegradação. (BENTO et al., 2005; HAMDI et al., 2007). Os microrganismos respondem de formas diferenciadas as condições do meio, substratos poucos solúveis em água geralmente são mais eficientes em relação à produção de biossurfactantes e alguns microrganismos produzem biossurfactantes apenas quando o meio contém substratos insolúveis que são os hidrocarbonetos, outros, porém são capazes de produzir mesmo com o meio contendo apenas substratos simples solúveis em água como carboidratos e aminoácidos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

1.4.3 Aplicação dos biossurfactantes

As propriedades dos biossurfactantes permitem a sua aplicação em muitas áreas, entre elas na indústria alimentícia, farmacêutica, petroquímica, agrícola e de cosméticos (AL-WAHAIBI et al., 2014; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015).

Alguns biossurfactantes podem atuar como inibidores de enzimas e toxinas, como antifúngicos, antivirais e antibióticos, alguns foram descritos como capazes de lisar eritrócitos de mamíferos, inibir a formação de coágulos; formar canais iônicos de membranas, entre outras atividades já descritas.

A ação de biossurfactantes em atividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos incluindo bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas, fungos e leveduras, não é totalmente conhecida, porém, acredita-se que essas moléculas atuem interferindo na permeabilidade da membrana citoplasmática, danificando assim a célula (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; ARAUJO; FREIRE, 2013).

Na agroindústria biossurfactantes podem ser usados para promover melhoria da qualidade do solo auxiliando na remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos, na eliminação de fitopatógenos e para aplicação na indústria de pesticidas (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Diversos novos tipos de biossurfactantes tem sido amplamente produzidos e apresentam grande potencial em propiciar melhorias em diversas atividades antropogênicas. Na agricultura podem ser usados principalmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Kim, Lee e Yun (2011) produziram a partir de *Pseudomonas* sp. um ramnolipídeo que apresentou atividade inseticida contra pragas agrícolas do tipo pulgões (*Myzus persicae*) afetando a organização celular do organismo após o tratamento com o biossurfactantes. Pesquisas de Piljac et al. (2008) sugerem que biossurfactantes classificados como ramnolipídeos podem ser usados com sucesso no tratamento de úlceras gástricas. No Quadro 3 é mostrado resumo dos principais usos comerciais dos biossurfactantes e inclui moléculas a utilização dessa substância em processos de biorremediação.

Quadro 3 – Principais usos comerciais dos biossurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrante de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcário-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

1.5 BIORREMEDIAÇÃO DOS AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

Diversos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes no ambiente são capazes de degradar uma grande variedade de substâncias orgânicas, entre elas o óleo diesel, e de produzir biossurfactantes (AL-WAHAIBI et al., 2014; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015), por isso desempenham papéis muito importantes nesses ambientes. A grande maioria dos microrganismos, especialmente as bactérias com capacidade de biodegradar os hidrocarbonetos provenientes do petróleo, o fazem por via aeróbica assim os processos se baseiam principalmente nas atividades aeróbicas de microrganismos.

A biorremediação se constitui uma excelente alternativa para descontaminação de ambientes poluídos por petróleo e seus derivados, devido ao fato de apresentar, baixo custo de implementação, e menor risco ambiental do que técnicas de limpeza que envolvem processos físicos e químicos (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010). Frequentemente os procedimentos feitos em casos de contaminação por petróleo e seus derivados consistem em contenção e recolhimento através de barreiras, adsorção entre outros que não objetivam a degradação do petróleo (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010). Nesse contexto a biorremediação é uma prática com grande potencial de utilização já que consiste no ato de utilizar materiais ou substâncias provenientes de organismos vivos ou mesmo atividades biológicas que possam acelerar os processos naturais de recuperação de ambientes

contaminados, pode se fazer uso, por exemplo de microrganismos capazes de degradar substâncias tóxicas, transformando-as em compostos, com pouquíssima ou nenhuma toxicidade.

A biorremediação é uma das tecnologias mais promissoras para a recuperação de áreas contaminadas pelos derivados do petróleo, especialmente o óleo diesel, pois é uma técnica com maior eficiência na remoção dos contaminantes do que técnicas químicas e físicas, além de ter seu custo relativamente mais baixo (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010).

Os microrganismos desempenham um papel importante na biorremediação, pois degradam ou convertem compostos poluentes, como o óleo diesel, em substâncias inofensivas (OLIVEIRA et al, 2012). Muitas bactérias que são capazes de degradação do óleo normalmente produzem biossurfactantes que permitem a emulsificação de alcanos (PENG et al., 2007; SHAO, 2010; WANG; SHAO, 2013), isso é importante, pois, a ação dos biossurfactantes aumenta a solubilidade e remoção dos contaminantes, derivados do petróleo melhorando as taxas de biodegradação do óleo (THAPA; AJAY KUMAR; GHIMIRE, 2012).

Tanto surfactantes sintéticos como os biossurfactantes possuem amplo potencial de utilização, quando relacionados a problemas ambientais advindos da contaminação por petróleo e seus derivados, porém, a utilização de biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos é vantajosa devido a suas características de menor toxicidade, alta biodegradabilidade, capacidade de modificação estrutural e síntese a partir de substratos renováveis (ARAÚJO; FREIRE, 2013). O uso de biossurfactantes que atuam facilitando a ação de alguns microrganismos na degradação de compostos provenientes do petróleo, recebem grande destaque como tecnologia alternativa no controle da poluição provocada por hidrocarbonetos do petróleo (RUFINO et al., 2014).

A biorremediação de ambientes contaminados por petróleo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos em metabolizar os poluentes, por condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores ou devido ao elevado custo (JOHNSON et al., 2005; JACQUES et al., 2007; TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho objetivou-se avaliar a produção de biossurfactantes e o potencial de degradação do óleo diesel dos isolados de bactérias e avaliar a dinâmica de crescimento de bactérias introduzidas em água do mar e no solo com adição do óleo diesel em condições laboratoriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os isolados de bactérias provenientes do solo e da água contaminados por petróleo;
- b) Analisar a produção de biossurfactantes por isolados bacterianos;
- c) Detectar os genes envolvidos na síntese de ramnolipídeos e na degradação de hidrocarbonetos de petróleo em bactérias;
- d) Analisar a dinâmica de crescimento de isolados bacterianos introduzidos no solo e na água do mar com adição de óleo diesel em experimento microcosmo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLADOS DE BACTÉRIAS

No presente estudo foram utilizados dez isolados provenientes de uma coleção de isolados de bactérias do Laboratório de Biologia de Microrganismos do Departamento de Biologia Molecular (CCEN/UFPB). As bactérias foram isoladas em pesquisas anteriores de amostras de solo do aterro dos resíduos contaminados com o petróleo em Icapuí – CE e de amostras da água da Lagoa de Baixo utilizada no descarte de água contaminada com o petróleo no Pólo Industrial de Guamaré – RN. Os isolados de bactérias foram mantidos em estoque no meio completo semi-sólido composto por 0,5 g de glicose, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona, 0,5 g de casaminoácidos, 0,5 g de amido, 0,2 g de K_2HPO_4 , 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 4,0 g de ágar e 1000 ml de água destilada (ALEF, 1995).

3.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS

3.2.1 Extração e Amplificação do DNA Bacteriano

A extração do DNA genômico dos isolados foi feita pelo método de Cheng e Jiang (2006) com algumas modificações. A extração teve início com a adição de 400 µl de tampão STE, pH 8,0 (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M; NaCL 5M) e centrifugação das células bacterianas por 5 min a 12.000 rpm. Em seguida o pelet foi ressuspensão em 200 µl de tampão TE constituído pela mistura de 100 mL de solução de Tris-HCl (1M, pH: 8,0)/ 20 mL de EDTA (0,5 M, pH: 8,0) e água, pH 8,0 e após isso foi adicionado 200 µl de perolas de vidro e 200 µl de fenol saturado (pH 8,0). Os microtubos foram então colocados no vórtex por 90 s e centrifugados por 5 min. a 12.000 rpm. Posteriormente foram retirados 160 µl do sobrenadante da amostra e adicionou-se 40 µl de TE e 100 µl de clorofórmio. Nova centrifugação das amostras foi feita (5 min. 12.000 rpm) e após a centrifugação removeu-se 160 µl da fase superior e adicionou 40 µl de TE e 5 µl de RNAase (10 mg/ml). A amostra foi incubada a 37 °C por 10 min. em banho-maria logo depois foi acrescentado e misturado 100 µl de clorofórmio/álcool isoamil (24:1), e novamente a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. O volume de 150 µl da fase superior contendo DNA foi colocado em um microtubo e congelado a -20 °C.

O DNA extraído foi submetido a quantificação e avaliação do grau de pureza utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV/Vis (USA).

O DNA extraído foi submetido à amplificação do gene RNAr 16S, essa amplificação foi feita utilizando os primers universais, 27F: 5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3' e 1492R: 5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT - 3'³¹ e um kit PCR Master Mix (Promega), segundo as recomendações do fabricante. A amplificação ocorreu nas seguintes condições de: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min., 25 ciclos (94°C por 1 min., 55 °C por 2 min. e 72 °C por 2 min.), extensão final a 72 °C por 10 min. O DNA amplificado obtido da de PCR (1000 pb) foi então purificado utilizando um kit EZ-10 Spin Column DNA Clean up Kit (Bio Basic Inc.), segundo as recomendações do fabricante. Após a purificação os produtos de PCR foram quantificados utilizando o NanoDrop ND-1000 UV/Vis (USA) e foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar o tamanho da banda do DNA amplificado.

3.2.2 Sequenciamento do Gene de RNAr 16S e Construção da Árvore Filogenética

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (Centro de Ciências Biológicas, UFPE), utilizando o primer 26F: 5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3' e o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências geradas foram submetidas à consulta de similaridade com os dados depositadas no GenBank acessado através do site do NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando o programa BLAST - “Basic Local Alignment Search Tools”. Também foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências e a construção da árvore filogenética utilizando o programa MEGA versão 7.

3.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR ISOLADOS DE BACTÉRIAS

3.3.1. Teste de Emulsificação

Os dez isolados foram avaliados quanto a produção de biossurfactantes nos seguintes meios:

- a) meio de Bushnell e Haas com 1% do óleo diesel como única fonte de carbono (BHO) (1g de K₂HPO₄, 1 g de NH₄NO₃, 0,2 g de MgSO₄. 7 H₂O, 0,05 g de FeCl₃, 0,02 g de CaCl₂. 2H₂O, 0,1 ml de óleo diesel, 1000 ml de água destilada),
- b) meio caldo nutriente (HiMedia) com adição de 1% de óleo diesel (CNO).

O teste de emulsificação, descrito por Batista et al. (2005) e Gaylarde (2000), demonstra a capacidade do isolado bacteriano em emulsificar o óleo diesel. Os índices de emulsificação

E5 (%) e E24 (%) foram calculados dividindo-se a altura da camada emulsificada pela altura total da coluna líquida multiplicado por 100. A razão entre o índice E5 e E24 foi utilizada para calcular a estabilidade da emulsão.

Os isolados foram incubados no meio de Bushnell e Haas e no meio caldo nutriente com adição de 1% de óleo diesel por 12 dias em temperatura de 30 °C sob agitação de 100 rpm. Após o período de incubação foram retirados 2 ml de cada cultura e colocados em tubos de ensaio, então foi adicionado em cada tubo 2ml de óleo diesel, os tubos foram agitados em vortex por 2 min. e deixados em repouso. Após 5 min. e 24 h de repouso foram feitas medições da altura da camada emulsificada e a altura total da coluna líquida. As culturas foram centrifugadas (15 min. a 6000 rpm) e o teste foi realizado com o sobrenadante livre de células para verificar a produção de biossurfactantes extracelulares. O teste com o sobrenadante foi realizado como foi descrito acima.

3.3.2 Atividade Hemolítica

O teste de hemólise foi realizado com o intuito de verificar a capacidade hemolítica dos isolados o que pode ser utilizado como indicador de produção de biossurfactantes. Para a realização do teste de hemólise, inicialmente, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio completo, e incubadas por 48 h, a 30 °C. Em seguida as bactérias foram inoculadas em meio Ágar Sangue (Difco), em de água destilada esterilizada, e 50 ml de sangue de coelho desfibrinado), o volume foi completado para 1000 ml e houve então a incubação por 48 h/30 °C.

A presença de zonas de hemólise foi indicativa de positividade no teste. O diâmetro de zonas de hemólise foi medido em milímetros.

3.3.3 Produção de Rhamnolipídeos

Os isolados de bactérias foram incubadas no meio BHO e CNO a 30 °C, por 12 dias sob agitação de 100 rpm, e foram submetidas a centrifugação, por 15 min. a 6000 rpm em temperatura ambiente. Desse material foi retirado 3 µl do sobrenadante e adicionados nos poços perfurados contendo CTAB-azul de metileno cuja a composição é (g/l) : NH_4Cl_2 – 1,49; KCL – 1,07; Tris-HCL – 18,91; MgSO_4 -0,19; glicose – 5,0; peptona – 10,0; brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) – 0,2; azul de metileno – 0,005; ágar – 20g e pH ~ 7,0 (SIEGMUND; WAGNER, 1991).

A produção de ramnolipídeos foi avaliada através da formação de um halo azul escuro em volta das colônias após incubação a 30 °C por 21 dias. A formação do halo azul é considerada indicativo de positividade.

3.4 DETECÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS E NA DEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO

3.4.1 Extração de DNA

Para realizar a detecção dos genes envolvidos na síntese de ramnolipídeos e na degradação do petróleo inicialmente foi realizada a extração do DNA genômico das isolados bacterianos seguindo o método de Cheng e Jiang (2006), descrito no item 3.2.1.

3.4.2 Detecção do Gene Envolvido da Produção de Ramnolipídeos

O DNA extraído foi utilizado para a detecção dos genes envolvidos no processo de síntese de ramnolipídios, para isso foi realizada PCR utilizando os primers: *rhlABF* 5' CAG GCC GAT GAA GGG AAATA 3' e *rhlABR* 5' AGG ACG ACG AGG TGG AAA TC 3' (KUMAR et al., 2012), os quais amplificam o fragmento de 1000 bp. A amplificação ocorreu nas condições de 95 °C durante 5 min., 30 ciclos de 30 s a 95 °C, seguido por emparelhamento de 1 min. a 50 °C, extensão de 2 min. a 72 °C, e um passo final de extensão 10 min. a 72 °C.

O DNA amplificado pela técnica de PCR foi examinado por meio da eletroforese em gel de agarose 1% contendo *GelRed* (0,1 µl/ml) utilizando o padrão de peso molecular de 100 bp (Axygen Biosciences) para visualizar a presença de uma única banda de 1000 pb.

3.4.3 Detecção do Gene Envolvido na Biodegradação de Hidrocarbonetos

O DNA extraído foi utilizado para a detecção dos genes envolvidos no processo de degradação de hidrocarbonetos do petróleo, para isso foi realizada PCR utilizando os primers: *alkBfd* 5' AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG 3' e *alkBRd* 5' TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC 3' (onde M=AC, R=AG and Y=CT) (POWELL et al., 2006), os quais amplificam o fragmento de 220 bp. A amplificação ocorreu nas condições de 95 °C durante 5 min., 30 ciclos de 30 s a 95 °C, seguido por emparelhamento de 1 min. a 50 °C, extensão de 2 min. a 72 °C, e um passo final de extensão 10 min. a 72 °C. O DNA amplificado pela técnica de PCR foi

examinado por meio da eletroforese em gel de agarose 1% contendo GelRed (0,1 µl/ml) utilizando o padrão de peso molecular de 100 bp (Axygen Biosciences) para visualizar a presença de uma única banda de 220 pb.

3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL NO EXPERIMENTO MICROCOSMO

Para avaliar o crescimento de isolados de bactérias ativas na degradação de óleo diesel foi preparado o experimento microcosmo, baseando-se nos trabalhos de Singh (2006) e Almeida (2012).

O solo utilizado no experimento foi retirado do Campus I da Universidade Federal da Paraíba (entre as coordenadas de 7° 8' 30,3" S e 34° 50' 44,5" W), o solo utilizado possui pH levemente ácido (6,2), concentração de potássio e ferro, fósforo e sódio, além de outros elementos encontrados em menor quantidade. Análise granulométrica revelou que o solo foi composto por areia grossa (60%), areia fina (27%), argila (11%) e silte (2%).

O solo foi peneirado através de uma peneira com orifícios de 2 mm, e autoclavado três vezes, por 40 min., em três dias subsequentes. Posteriormente, foi determinada 55% da capacidade de saturação do solo e o déficit de umidade do solo. Para determinar a capacidade de saturação 20 g do solo foram colocadas em 3 cadinhos de vidro que foram deixados por 3 h no recipiente com água e logo em seguida pesados e colocados em estufa à 105 °C para secagem por 24 h, após esse período, os cadinhos foram retirados da estufa e colocados em um dessecador por aproximadamente uma hora, até que a temperatura deles se igualasse a temperatura ambiente, os cadinhos então foram novamente pesados e calculou-se 55% da capacidade de saturação do solo. Para determinar déficit de umidade 20 g do solo foi colocado em 3 béqueres de 100 ml e pesados, logo após foram deixados em estufa à 105 °C por 3 h e então pesados novamente. Foi então calculado o déficit de umidade seguindo a Equação 1.

$$\% \text{ déficit de umidade} = \frac{\text{peso (úmido)} - \text{peso(seco)}}{\text{peso (úmido)}} \times 100 \quad (1)$$

No experimento foram utilizados 30 Béqueres de 100 ml, contendo 50 g de solo cada, e selecionados dois isolados mais ativos na degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes. O solo utilizado no experimento foi previamente deixado para secagem em temperatura ambiente por 72 h.

Em cada amostra foi adicionado 1 ml de óleo diesel estéril sem aditivos, 12 ml de água destilada estéril, (para atingir 55% da capacidade de saturação do solo) e 100 µl de solução de 2% NH_4NO_3 . Os componentes foram então homogeneizados com espátula de metal por 5 min. Após a homogeneização foi adicionado 1 ml de solução padronizada de células de bactérias (McFarland 4), obtidas a partir do cultivo em meio líquido completo por 24 h à 30 °C, seguida por centrifugação das culturas a 6.000 rpm e suspensão em NaCl 0,9%.

Foram preparados cinco controles sem a adição de inóculo, sendo adicionado ao solo nesses controles, 1 ml de óleo diesel, 12 ml de água destilada estéril e 100 µl de NH_4NO_3 (2%), então foi realizada a homogeneização por cinco minutos.

Os béqueres foram vedados com parafilme e incubados em caixa úmida, no escuro, sob temperatura de 30 °C.

Foram feitas as contagens de bactérias no tempo de 0, 5, 10, 15 e 30 dias, utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade no meio completo modificado (ALEF, 1995). Para cada ensaio foram utilizadas duas amostras do solo. As diluições decimais de cada amostra foram feitas utilizando 5 g do solo e solução salina 0,9% de NaCl. Alíquotas de 0,1 ml das diluições do solo foram adicionadas em uma placa estéril e posteriormente ocorreu a adição do meio completo.

Após a incubação das placas por 5 dias na estufa, a 30 °C, foi realizada a contagem de colônias. O número de bactérias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco.

3.6 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA DO MAR CONTAMINADA COM ÓLEO DIESEL NO EXPERIMENTO MICROCOSMO

Para avaliar o crescimento de bactérias ativas na degradação de óleo diesel em água do mar; com adição de 0,5 ml de óleo diesel, foi preparado o experimento microcosmo, baseando-se no trabalho de Jurelevicius et al. (2013). Foi utilizada água do mar coletada da praia de Cabo Branco-JP/PB, filtrada e esterilizada pela autoclavação.

Foram selecionados dois isolados ativos na degradação de hidrocarbonetos e produção de biossurfactantes, os quais, inicialmente, foi avaliado a capacidade de crescimento em meio caldo nutriente (HiMedia) preparado em água do mar. O crescimento bacteriano foi observado após 24 h de incubação a 30 °C.

Para cada isolado foram preparados 2 balões de fundo redondo de 1 l contendo cada um 500 ml de água do mar, 0,5 ml de óleo diesel, 0,05 g de NH_4NO_3 e 0,005g de KH_2PO_4 , na proporção de C:N:P - 100:10:1 (JURELEVICIUS et al., 2013). Para o inóculo foi utilizado 1

ml da cultura, obtida em meio caldo nutriente com água do mar incubada por 24 h a temperatura de 30 °C.

Os balões foram envolvidos em papel alumínio e mantidos em incubação, no escuro, sob agitação de 80 rpm e temperatura de 30 °C pelo período de 30 dias.

Foram realizadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 30 as quantificações de bactérias pela técnica de plaqueamento em profundidade, como foi descrito no item 3.5, sendo que para o preparo de diluições decimais foi retirada alíquota de 1 ml da água do microcosmo.

Após a incubação das placas por 5 dias na estufa, a 30 C°, foi realizada a contagem de colônias. O número de bactérias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de água.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise estatística dos dados referentes ao experimento de microcosmo, no solo e na água, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com intervalo de confiança de 95%, realizado através do programa GraphPad Prism na sua versão 7, os dados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS

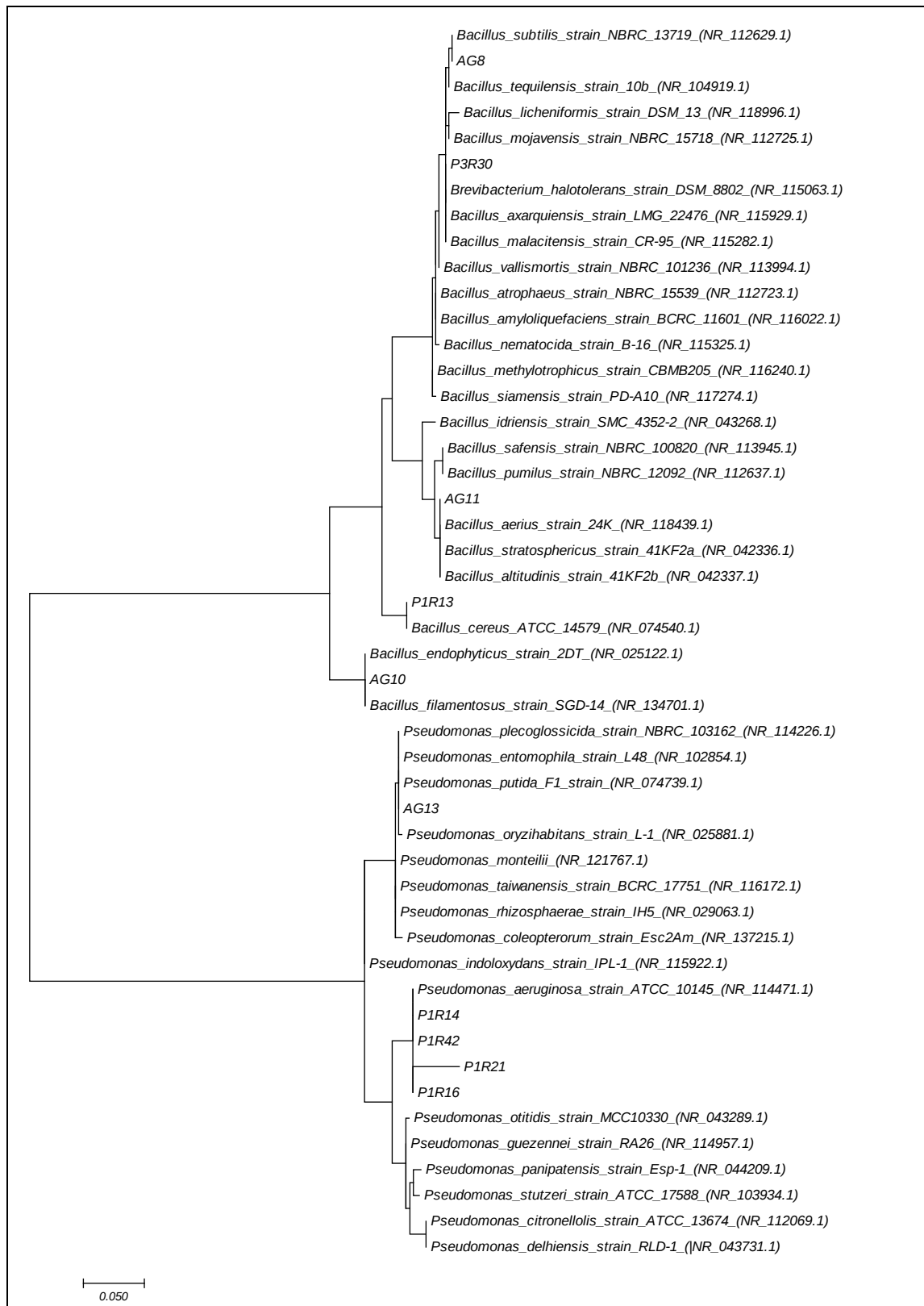
Os dez isolados de bactérias analisados neste trabalho foram identificadas com base na análise filogenética das sequências do gene RNAr 16S. O alinhamento das sequências parciais dos isolados analisados e das sequências depositadas no banco NCBI (National Center for Biotechnology Information), pela ferramenta BLAST – “Basic Local Alignment Search Tools” revelou que cinco isolados pertenceram ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. endophyticus*, *B. aerius*, *B. cereus*, com 98-100% de similaridade do gene RNAr 16S) e cinco isolados ao gênero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* e *P. putida* com 99% de similaridade do gene RNAr 16S), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Identificação dos isolados de bactérias com base nas análises do BLAST das sequências do RNAr 16S.

Isolados	Alinhamento mais significativo	Código de acesso - NCBI	E-value	Identidade máxima (%)
AG8	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_113265.1	0,0	99
AG10	<i>Bacillus endophyticus</i>	NR_025122.1	0,0	99
AG11	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	0,0	100
P1R13	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	0,0	98
P3R30	<i>Bacillus subtilis</i>	NR_112686.1	0,0	99
P1R14; P1R16; P1R21; P1R42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_074828.1 NR_117678.1 NR_114471.1	0,0	99
AG13	<i>Pseudomonas putida</i>	NR_074739.1	0,0	99

Fonte: Próprio Autor (2017).

Figura 8 – Árvore filogenética dos isolados de bactérias e linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2. Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 réplicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostrados em parênteses.



Fonte: Próprio Autor (2017).

4.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Todos os isolados apresentaram crescimento em meio de Bushnell e Haas com óleo diesel (BHO) e também em meio caldo nutriente com óleo diesel (CNO). Em meio BHO com culturas celulares a capacidade de emulsificação após 24 h (E24) foi observada em 30% dos isolados. Com o sobrenadante livre de células no meio BHO, a capacidade de emulsão foi observada em 40% dos isolados. A estabilidade de emulsão no meio BHO variou de 0,5 a 0,9 (Tabela 2). No meio CNO com as culturas celulares a capacidade de emulsão foi observada em 40% dos isolados. Com o sobrenadante livre de células em meio CNO, a capacidade de emulsão foi observada em 20% dos isolados. A estabilidade de emulsão no meio CNO variou de 0,6 a 1,0 (Tabela 2).

Tabela 2 – Índices de emulsificação de óleo diesel por bactérias cultivadas no meio Bushnell e Haas contendo óleo diesel (BHO) e extrato de levedura e no meio caldo nutriente contendo óleo diesel (CNO).

Isolado	Meio BHO						Meio CNO					
	Cultura			Sobrenadante			Cultura			Sobrenadante		
	E5%*	E24%*	ES**	E5%*	E24%*	ES**	E5%*	E24%*	ES**	E5%*	E24%*	ES**
<i>Bacillus</i>												
AG8	–	–	–	–	–	–	52,0	–	–	20,0	–	–
AG10	67,5	–	–	70,0	32,0	0,5	46,0	46,0	1,0	36,6	33,3	0,9
AG11	–	–	–	–	–	–	34,9	–	–	20,0	–	–
P1R13	36,6	–	–	–	–	–	46,0	34,0	0,7	42,0	–	–
P3R30	29,9	–	–	27,7	–	–	40,0	–	–	26,0	–	–
<i>Pseudomonas</i>												
AG13	–	–	–	–	–	–	60,0	–	–	30,0	–	–
P1R14	–	–	–	–	–	–	75,0	–	–	40,0	–	–
P1R16	55,5	52,0	0,9	55,5	45,0	0,8	45,2	–	–	83,0	–	–
P1R21	70,0	60,0	0,8	79,9	48,3	0,6	81,1	51,0	0,6	84,0	41,0	0,5
P1R42	49,0	46,6	0,9	54,0	50,0	0,9	84,9	50,0	0,6	30,0	–	–

Notas: (–) ausência de emulsão;

* E5% e E24%= índices de emulsificação após 5 min, e após 24h de repouso, respectivamente;

** ES= estabilidade.

Fonte: Próprio Autor (2017).

Notas: (–) ausência de emulsão;

* E5% e E24%= índices de emulsificação após 5 min, e após 24h de repouso, respectivamente;

** ES= estabilidade.

Fonte: Próprio Autor (2017).

Figura 9 – Emulsificação do óleo diesel por sobrenadante livre de células em caldo nutriente com adição de óleo diesel (CNO) (isolado AG10).



Fonte: Próprio autor (2017).

No teste de hemólise todos os isolados bacterianos apresentaram halo hemolítico que variou em diâmetro de 13,5 mm a 37,5 (Tabela 3).

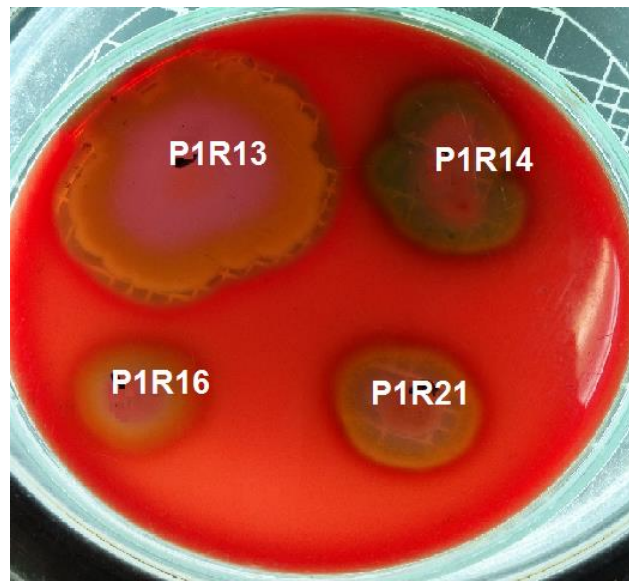
Tabela 3 – Atividade hemolítica dos isolados de bactérias.

Isolados	Diâmetro do halo (mm)	Isolados	Diâmetro do halo (mm)
<i>Bacillus</i>		<i>Pseudomonas</i>	
AG8	19,0	AG13	15,0
AG10	13,5	P1R14	27,5
AG11	21,0	P1R16	18,0
P1R13	37,5	P1R21	20,0
P3R30	28,0	P1R42	15,0

Próprio Autor (2017).

O isolado P1R13 destacou-se dos demais isolados apresentando o maior halo hemolítico (Figura10).

Figura 10 – Atividade hemolítica dos isolados de bactérias.
Resultado positivo para os isolados P1R13, P1R14, P1R16 e P1R21.

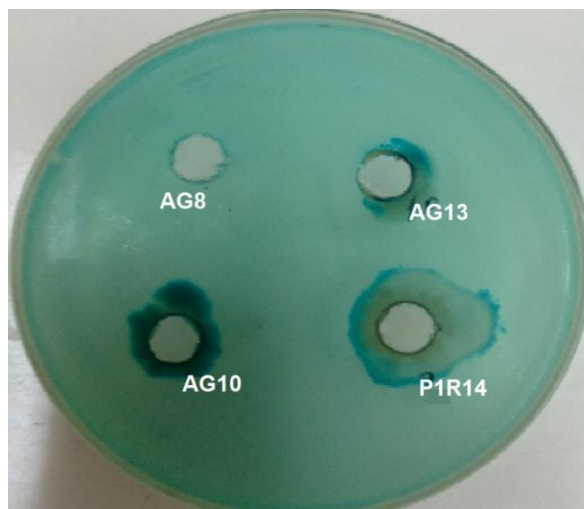


Fonte: Próprio autor (2017).

4.3 PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS E PRESENÇA DO GENE *rhlAB*

Dos isolados testados quanto a produção de ramnolipídeos sete isolados (63,6%) formaram halo azul em volta da colônia, indicativo de positividade para a produção de biosurfactantes (Tabela 4; Figura 11). A formação de halo azulado em volta da colônia ocorre pela da formação de um par iônico insolúvel na presença de CTAB, azul de metileno e um biosurfactante aniônico (SIEGMUND, 1991).

Figura 11 – Detecção da produção de ramnolipídeos no meio com CTAB-azul de metileno nos isolados de bactérias. Isolados positivos: AG13, AG10 e P1R14; isolado negativo: AG8.



Fonte: Próprio Autor (2017).

Tabela 4 – Produção de ramnolipídeos em meio contendo brometo cetiltrimetilamônio e azul de metileno.

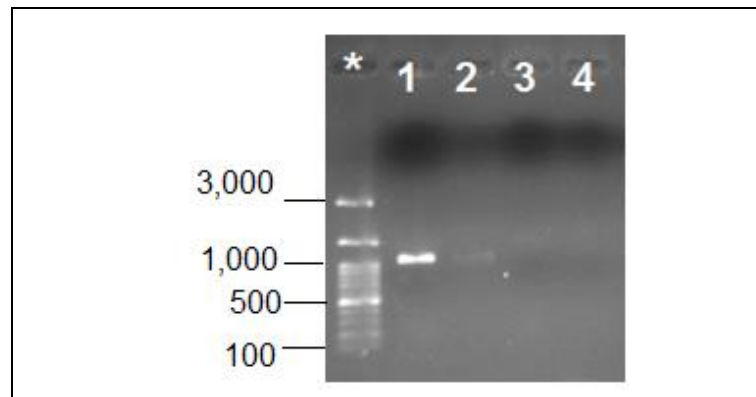
Isolados	Produção de ramnolipídeos	Isolados	Produção de ramnolipídeos
<i>Bacillus</i>		<i>Pseudomonas</i>	
AG8	–	AG13	+
AG10	+	P1R14	+
AG11	–	P1R16	+
P1R13	–	P1R21	+
P3R30	+	P1R42	+

Nota: (–) Negativo; (+) Positivo

Fonte: Próprio Autor (2017).

O gene *rhlAB* envolvido na produção de ramanolipídeos foi detectado nos isolados P1R14, P1R16, P1R21 e P1R42, todos estes foram identificados como pertencentes a espécie *P. aeruginosa*. A Figura 12 mostra a banda do gene *rhlAB* correspondente aos 1000 pb do isolado P1R14 (Figura 12).

Figura 12 – Detecção do gene *rhlAB* em isolados de bactérias. Linhas: DNA ladder 100 pb (*), isolados positivos: P1R14 (1); isolados negativos: AG10 (2), AG11 (3), AG13 (4).

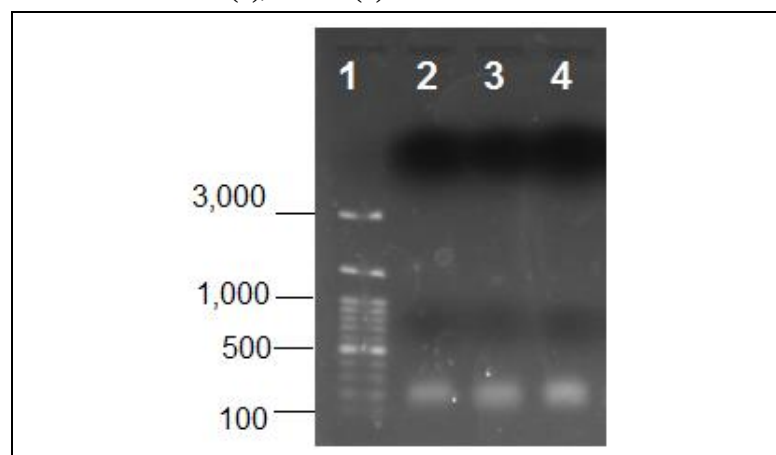


Fonte: Próprio Autor (2017).

4.4 PRESENÇA DO GENE *alkB* ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

O gene *alkB* envolvido na degradação do óleo diesel foi detectado em 9 dos 10 isolados testados, os quais apresentaram o produto de PCR de 220 pb. Este gene não foi detectado apenas em isolado AG13. A Figura 13 mostra o resultado de amplificação por PCR do gene testado dos isolados AG8, AG10 e P1R14.

Figura 13 – Detecção do gene *alkB* em isolados de bactérias. Linhas: DNA ladder 100 pb (1), isolados positivos: AG8 (2), AG10 (3), P1R14 (4).



Fonte: Próprio Autor (2017).

4.5 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTRODUZIDAS NO SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL (MICROCOSMO)

O microcosmo com solo contaminado com óleo diesel foi realizado com dois isolados de *P. aeruginosa* (P1R16 e P1R42), utilizados separadamente,

Os resultados mostram que a densidade do isolado P1R16 atingiu valores máximos após 5 e 10 dias de experimento, e do isolado P1R42 após 5 dias (Tabela 5, Figura 14). Após 15 dias de incubação, porém, as contagens de todos os isolados apresentaram um leve decréscimo que se acentuou no tempo de 30 dias. De acordo com o teste de Kruskal-Wallis as diferenças nas densidades ao longo do experimento foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para ambas linhagens testadas.

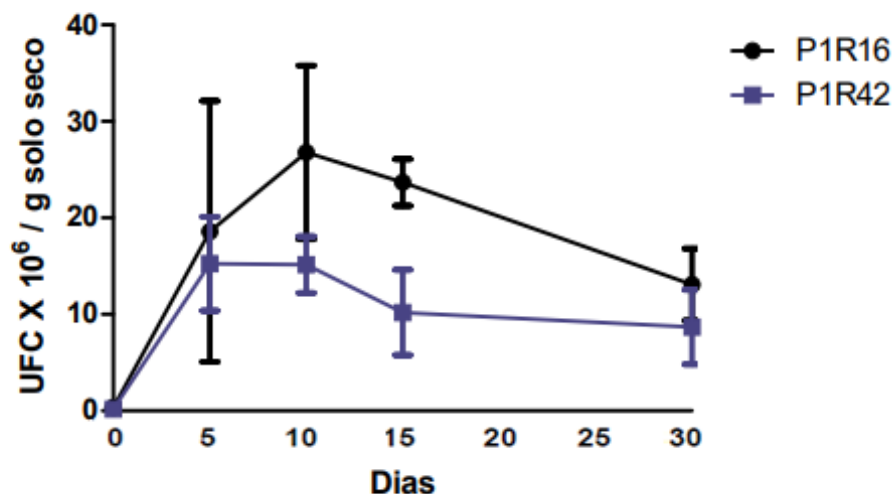
Tabela 5 – Contagens de bactérias (UFC/g de solo seco) dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.

Isolados	Dias de incubação				
	0	5	10	15	30
P1R16 A*					
Média	$0,48 \times 10^6$	$22,5 \times 10^6$	$20,7 \times 10^6$	$19,9 \times 10^6$	$12,2 \times 10^6$
Desvio padrão	$0,06 \times 10^6$	$9,29 \times 10^6$	$8,03 \times 10^6$	$2,94 \times 10^6$	$4,43 \times 10^6$
P1R16 B					
Média	$0,21 \times 10^6$	$14,6 \times 10^6$	$35,1 \times 10^6$	$25,8 \times 10^6$	$14,0 \times 10^6$
Desvio padrão	$0,03 \times 10^6$	$4,36 \times 10^6$	$1,06 \times 10^6$	$3,09 \times 10^6$	$2,56 \times 10^6$
P1R42 A					
Média	$0,94 \times 10^6$	$19,0 \times 10^6$	$17,2 \times 10^6$	$12,5 \times 10^6$	$12,0 \times 10^6$
Desvio padrão	$0,06 \times 10^6$	$3,14 \times 10^6$	$1,26 \times 10^6$	$3,64 \times 10^6$	$1,24 \times 10^6$
P1R42 B					
Média	$0,14 \times 10^6$	$11,5 \times 10^6$	$13,1 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
Desvio padrão	$0,38 \times 10^6$	$2,03 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$3,64 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$

* O experimento foi conduzido em duplicata (A e B).

Fonte: Próprio Autor (2017).

Figura 14 – Contagens de bactérias dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos no solo com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.



Fonte: Próprio Autor (2017).

4.6 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS INTRODUZIDAS NA ÁGUA DO MAR CONTAMINADA COM ÓLEO DIESEL (MICROCOSMO)

O microcosmo com água do mar contaminada com óleo diesel foi realizado com os mesmos isolados utilizados para o microcosmo com solo (*P. aeruginosa* P1R16 e P1R42).

O experimento microcosmo na água do mar mostrou que os isolados bacterianos foram capazes de crescer em água do mar com adição do óleo diesel como fonte de carbono.

O experimento microcosmo com o isolado P1R16 revelou que houve aumento da densidade populacional nos tempos 5 e 10 dias, mantendo-se em quinze dias praticamente estáveis. Após 30 dias de incubação deste isolado houve um leve decréscimo nas contagens (Tabela 6).

No experimento com o isolado P1R42 foi possível verificar que também houve aumento da densidade populacional após 5 e 10 dias de incubação, porém após 30 dias de incubação houve diminuição da sua densidade (Tabela 6 e Figura 15).

As diferenças nas densidades ao longo do experimento foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis para ambas linhagens testadas.

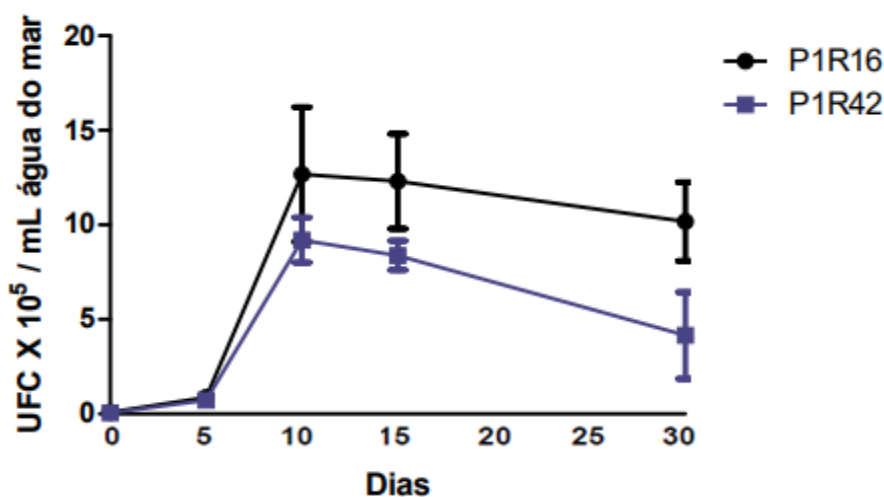
Tabela 6 – Contagens de bactérias (UFC/ml de água do mar) dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidos na água com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.

Isolados	Dias de incubação				
	0	5	10	15	30
P1R16 A*					
Média	$0,11 \times 10^5$	$0,72 \times 10^5$	$10,0 \times 10^5$	$9,90 \times 10^5$	$8,60 \times 10^5$
Desvio padrão	$0,00 \times 10^5$	$0,08 \times 10^5$	$1,78 \times 10^5$	$0,76 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$
P1R16 B					
Média	$0,07 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$15,3 \times 10^5$	$14,7 \times 10^5$	$12,1 \times 10^5$
Desvio padrão	$0,00 \times 10^5$	$0,02 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$0,93 \times 10^5$	$0,65 \times 10^5$
P1R42 A					
Média	$0,06 \times 10^5$	$0,50 \times 10^5$	$8,40 \times 10^5$	$8,70 \times 10^5$	$5,20 \times 10^5$
Desvio padrão	$0,01 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$	$0,70 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$
P1R42 B					
Média	$0,05 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$	$10,0 \times 10^5$	$8,10 \times 10^5$	$3,60 \times 10^5$
Desvio padrão	$0,00 \times 10^5$	$0,02 \times 10^5$	$0,89 \times 10^5$	$0,76 \times 10^5$	$2,51 \times 10^5$

* O experimento foi conduzido em duplicata (A e B).

Fonte: Próprio Autor (2017).

Figura 15 – Contagens de bactérias dos isolados P1R16 e P1R42 introduzidas na água do mar com óleo diesel ao longo de 30 dias do experimento microcosmo.



Fonte: Próprio Autor (2017).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados isolados bacterianos identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, os quais foram obtidos de ambientes contaminados por petróleo para averiguar seu potencial na degradação dos hidrocarbonetos do petróleo e na produção de biossurfactantes.

Na literatura bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são amplamente descritas como constituintes das comunidades microbianas em ambientes contaminados por petróleo, e destaca-se o potencial desse gênero em fazer uso dos hidrocarbonetos presentes no petróleo como fonte de carbono e energia (NAPP et al., 2015; CRUZ et al., 2011; NKWELANG et al., 2008).

O gênero *Pseudomonas* apresenta espécies capazes de produzir biossurfactantes, especialmente ramnolipídeos, e se destaca por conter as espécies eficazes na degradação dos hidrocarbonetos do petróleo, frequentemente encontradas em ambientes contaminados por hidrocarbonetos (CAMEOTRA; SINGH, 2009; JARAMILLO; PABA; OSPINO, 2010; NAPP et al., 2015; CÂMARA et al., 2016).

A produção de biossurfactantes por isolados bacterianos é muito importante devido ao grande potencial que essas substâncias apresentam em processos de biorremediação, já que podem atuar facilitando a biodegradação e aumentando a biodisponibilidade de hidrocarbonetos do petróleo (MINF et al., 2011). A produção de ramnolipídeos tem sido investigada principalmente em espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (WITTGENS et al., 2011; WIGNESWARAN et al., 2016).

Foi verificado que grande parte dos isolados tiveram resultados positivos quanto a emulsificação e a estabilidade da emulsão, o que pode indicar o potencial desses isolados no processo de biorremediação, considerando-se que a capacidade de emulsificar de óleos aumenta a taxa de degradação destes compostos (NAPP et al., 2015). A estabilidade das emulsões é um fator de grande importância, estudos de Decesaro et al. (2013) indicam que biossurfactantes que formam emulsões estáveis podem ser utilizados em processos de biorremediação, e segundo Mnif et al. (2011) é clara a relação entre a produção de biossurfactantes e a biodegradação de hidrocarbonetos.

No presente trabalho, 40% dos isolados apresentaram emulsões estáveis quando utilizados sobrenadantes livres de células, indicando a presença de biossurfactantes extracelulares. Este tipo de biossurfactantes é vantajoso, pois, facilita o processo de sua

recuperação e aplicação, sendo, portanto, preferencial para a indústria (MINF et al., 2011; LEITE et al., 2016).

O teste de hemólise, é amplamente utilizado para rastrear os isolados envolvidos na produção de biossurfactantes (THAVASI et al., 2013; SHAVANDI et al., 2011). Todos os isolados testados nesse trabalho foram positivos em relação ao teste de hemólise, indicando a produção de dois tipos de biossurfactantes que são: surfactina ou ramnolipídeos (YOUSSEF et al., 2004; THAVASI et al., 2013). Devido ao fato de que outros fatores como a produção de hemolisinas pelos microrganismos ou fatores de virulência podem lisar as células sanguíneas nos testes de hemólise podem ocorrer resultados falso positivos (YOUSSEF et al., 2004; LEITE et al., 2016). Ainda assim, Carrillo et al. (1996) afirmam haver associação entre atividade hemolítica e a produção de biossurfactantes e recomendaram o uso do teste de hemólise como um método primário para rastrear a produção destes compostos.

O teste para produção de ramnolipídeos em meio CTAB-azul de metileno revelou que grande parte dos isolados testados foram positivos. Outros trabalhos como os de Walter, Sylatk e Hausmann (2010), Kumar et al. (2012) e Plociniczak et al. (2014) também fizeram uso deste teste para rastreio de linhagens produtoras de biosurfactantes e especialmente de ramnolipídeos. Aparna, Srinikethan e Smitha (2012) e Sarafin et al. (2014) detectaram ramnolipídeos produzidos por espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* utilizando o método CTAB-azul de metileno.

O gene *rhlAB*, comumente encontrado em *P. aeruginosa* (DUBEAU et al., 2009; LEITE et al., 2016), é relatado na literatura como envolvido na produção de ramnolipídeos (MEDINA; JUÁREZ; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2003). Nesse trabalho quatro isolados foram positivos para a presença desse gene. Segundo Déziel et al. (2013) e Wigneswaran et al. (2016) a biossíntese de ramnolipídeos em *P. aeruginosa* envolve outros genes além do gene *rhlAB*, sugerindo que outros isolados positivos no meio CTAB-azul de metileno e negativos com relação a presença do gene *rhlAB* podem possuir outros genes envolvidos na produção destes compostos.

O gene *alkB* na literatura é amplamente utilizado como biomarcador na detecção de isolados bacterianos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos, pois, a enzima codificada pelo gene *alkB* é responsável pela hidrólise de alcanos (JURELEVICIUS et al., 2013; VIGGOR et al., 2013; NIE et al., 2014), os quais são os principais compostos encontrados no petróleo e seus derivados. Nesse trabalho em nove dos dez isolados foi detectado o gene *alkB*. Pesquisas de Paisse et al. (2011), Wang et al. (2013), Viggo et al. (2013) e Das, Yang e MA (2014) mostram que várias espécies bacterianas possuem diversos genes que codificam

enzimas ativas na degradação de hidrocarbonetos, entre essas enzimas inclui-se a alcano monoxigenase codificada pelo gene *alkB*, ressaltando-se que outros genes podem estar envolvidos na biodegradação de alcanos, e que muitas vias relacionadas com a degradação de hidrocarbonetos por microrganismos podem ainda ser desconhecidas (ANNWEILER; MICHAELS; MECKENSTOCK, 2002; KOMA; CHUNG; KUBO, 2003; NAPP et al., 2015). Viggor et al. (2013) constatou a presença do gene *alkB* em bactérias que apresentam crescimento em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Dois isolados identificadas como *P. aeruginosa*, os mais ativos na emulsificação e degradação de petróleo, foram utilizados nos experimentos de microcosmo desse trabalho. Essa espécie bacteriana já é descrita por sua capacidade em utilizar os hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia (DAS; CHANDRAN, 2011).

Nos experimentos microcosmo do solo e da água do mar, na presença de 1% de óleo diesel, os isolados apresentaram considerável crescimento bacteriano após 5 dias de incubação. Esses dados corroboram com Gertle et al. (2012) que relatam que o aumento inicial no número de células de bactérias é comum na degradação do óleo devido ao aumento súbito dos níveis de carbono.

No experimento de microcosmo do solo observou-se diminuição da contagem de bactérias após 15 dias, é provável que isso se dê devido à diminuição de hidrocarbonetos facilmente degradáveis, como pode ser visto no trabalho de Lin et al. (2011). No experimento de microcosmo realizado por Asadirad et al. (2016), as linhagens bacterianas após o período de 30 dias de incubação no solo contaminado com petróleo apresentaram morte celular. Bento et al. (2005) demonstram que a maior taxa de degradação de óleo diesel, em experimento microcosmo no solo contaminado, é observada nas primeiras semanas. Após esse período a maior parte dos hidrocarbonetos já foi degradado e portanto, a diminuição de disponibilidade de nutrientes pode limitar o crescimento microbiano. É possível também, que os produtos intermediários tóxicos formados na degradação de hidrocarbonetos possa inibir a o crescimento e ação de microrganismos (BENTO et al., 2005).

No experimento de microcosmo da água do mar observou-se aumento da densidade populacional após 5 dias de incubação e leve diminuição da contagem de bactérias após 15 dias, corroborando com dos dados obtidos por Jurelevicius et al. (2013) que constataram diminuição da densidade populacional de bactérias testadas devido a diminuição de concentração de hidrocarbonetos quando comparada as concentrações iniciais do experimento.

Vários fatores nutricionais e físico-químicos, além de concentração de petróleo, podem afetar o crescimento de bactérias introduzidas no solo ou água contaminados por

petróleo. A adição de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 como fontes de nitrogênio e fósforo pode estimular o crescimento de bactérias que precisam de macro nutrientes para garantir a degradação efetiva do óleo (ATLAS, 1995). Millioli et al. (2008) constatam que o nitrogênio em forma de NH_4 ou NH_3 é facilmente assimilado pelos microrganismos, estimulando a biodegradação dos contaminantes. Lin et al. (2011) verificaram que embora o nitrogênio seja sugerido como o principal nutriente inorgânico limitante na biorremediação do solo a taxa de degradação de petróleo aumenta substancialmente com o aumento da concentração de fósforo no solo.

Considerando que a água do mar consiste em um ambiente com menor concentração de nutrientes, quando comparada ao solo, é notável o fato de que nesse trabalho ambos os ambientes tiveram resultados semelhantes quanto a dinâmica populacional, em pesquisas de Jurelevicius et al. (2013) a água do mar também não foi limitante ao crescimento celular bacteriano. Apesar da alta salinidade, esse fato não afetou a dinâmica populacional dos isolados neste trabalho. Minf et al. (2011) relataram também que as concentrações elevadas de NaCl não afetou a capacidade de crescimento de microrganismos, tampouco afetou a capacidade de produção de biosurfactantes por esses seres.

Nesse trabalho buscou-se encontrar isolados capazes de utilizar o óleo diesel como fonte de carbono e que podem oferecer potencial de utilização em processos de biorremediação de ambientes contaminados com óleo diesel (ANDRADE; AUGUSTO; FONTES JARDIM, 2010). O uso da biorremediação como uma estratégia de limpeza suplementar no derramamento de óleo envolvendo o navio petroleiro Exxon Valdez, no Alasca, provou ser um bom exemplo da aplicação prática desta tecnologia (LUO et al., 2014). Em ambientes contaminados pelos hidrocarbonetos do petróleo o êxito no processo de biorremediação além de depender de fatores ambientais e da composição do contaminante, depende também da disponibilidade de microrganismos adequados (JARAMILLO; PABA; OSPINO, 2010).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam o potencial de isolados de *P. aeruginosa* para uso na biorremediação de solos e água do mar contaminados por petróleo. Pesquisas futuras se tornam necessárias para avaliar a taxa de degradação de hidrocarbonetos por isolados analisados e otimizar as condições para a biorremediação.

6 CONCLUSÕES

- 1) Os isolados de bactérias analisados nesse estudo foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*.
- 2) A maioria dos isolados bacterianos apresentaram capacidade de emulsificação do óleo diesel e produção de biossurfactantes.
- 3) O gene de alcano monoxigenase (*alkB*) relacionado a capacidade de degradar o óleo diesel, foi encontrado em todos os isolados de bactérias, com exceção de *Pseudomonas* sp. AG13.
- 4) Todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram o gene *rhlAB*, que é relacionado a produção de ramnolipídeos, nos isolados do gênero *Bacillus* esse gene não foi detectado.
- 5) Os experimentos microcosmo com solo e água do mar com adição de 1% de óleo diesel revelaram que a densidade máxima dos isolados bacterianos de *P. aeruginosa* P1R16 e P1R42 foi atingida após 5 e 10 dias de incubação, respectivamente.
- 6) Os isolados *P. aeruginosa* P1R16 e P1R42 analisados neste estudo são promissores para uso em processo de biorremediação, sendo necessário a realização de pesquisas mais detalhadas utilizando os consórcios microbianos e otimização de condições nutricionais e físico-químicas de microcosmo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HAUSMANN, R.; LE'PINE, F.; MÜLLER, M. M.; DÉZIEL, E. *Rhamnolipids*: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: G. Soberon-Chavez (ed.), **Biosurfactants, Microbiology Monographs**, v. 20, p. 13-55, 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, n. 1-3, p. 143-151, mar. 2008.

AL-ARAJI, R. R.; BASRI, M.; SALLEH, A. Optimisation of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 181 using response surface modeling. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 571-5, 2007.

ALEF, K. N. P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Londres: Academic Press, 1995. 576 p.

ALMEIDA, T. C. M. **Degradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de ambientes contaminados por petróleo**. 2012. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). 60.f. Universidade Federal da Paraíba (UFPB). João Pessoa, 2012.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-33, 2014.

AMBIENTES BRASIL. **Principais acidentes com petróleo e derivados no Brasil**. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/acidentes_ambientais/principais_acidentes_com_petroleo_e_derivados_no_brasil.html>. Acesso em: 26 nov. 2016.

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

ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; MECKENSTOCK, R. U. Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 852-8, 2002.

ANP. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Petróleo**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-e-derivados2/petroleo>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

_____. **Relatório da Comissão de Investigação ANP/DPC (2001)**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/?dw=23386>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-58, 2013.

ASADIRAD, M. H. A.; MAZAHARI ASSADI, M.; RASHEDI, H.; NEJADSATTARI, T. Effects of indigenous microbial consortium in crude oil degradation: a microcosm experiment. **International Journal of Environmental Research**, v. 10, n. 4, p. 491-8, Autumn, 2016.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 45, n. 5, p. 317-27, 1995.

ATLAS, R. M., and HAZEN, T. C. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. **Environmental Science & Technology**, 45(16), 6709–6715, 2011.

AUSTIN, R. N. E.; GROVES, J. T. Alkane-oxidizing metalloenzymes in the carbon cycle. **Metallomics**, v. 3, n. 8, p. 775-87, 2011.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-44, 2010.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM F. R.; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 868-75, 2005.

BAZIRE, A.; DHEILLY, A.; DIAB, F.; MORIN, D.; JEBBAR, M.; HARAS, D.; DUFOUR, A. Osmotic stress and phosphate limitation alter production of cell-to-cell signal molecules and rhamnolipid biosurfactante by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 125-31, 2005.

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

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVILE, H. On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. **Arkiv för Kemi, Mineralogi Och Geologi**, 23A, p. 1-12, 1946.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. Production of organic mercury from Hg⁰: experiments using microcosms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 244-8, 2003.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2014**: Ano Base 2013: Relatório Síntese. Rio de Janeiro: EPE, 2014.

British Petroleum. **BP Statistical Review of World Energy 2014**. London, 2014.

CABRAL, C. A. O.; TEXEIRA, L. S. P. **Investigação do incidente de vazamento de petróleo no Campo de Frade - Relatório Final** – ANP. SSM, Julho, 2012.

CÂMARA, J. M. D. A.; SOUSA, M. A. S. B.; NETO, E. L. B.; MAFRA, G. P. **Otimização da produção do biosurfactante ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa***. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza, CE, 2016.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2009.

CAO, Y.; XU, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; YANG, X.; CHEN, L.; SHEN, B.; SHEN, Q. R. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 32-9, 2012.

CARRILLO, P. G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 82-4, 1996.

CECCATO, H. D. **Produção e aplicação de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LB1**. 2013. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro (SP), 2013.

CETESB. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Ambientes costeiros contaminados por óleo: procedimentos de limpeza - manual de orientação**. São Paulo: CETESB, 2007. Disponível em: < <http://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/wp-content/uploads/sites/53/2013/12/ambientes-costeiros.pdf> >. Acesso em: 10 out. 2016.

CHAPRÃO, M. J.; FERREIRA, I. N. S.; CORREA, P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, E. J.; SARUBBO, L. A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18. n. 6, p. 471-9, 2015.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 55-9, 2006.

COSTA, S. G. V. A. O.; LEPIE, F.; MILOT, S.; DEZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1063-72, 2009.

CRUZ, G. F.; VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F. F.; DELLAGNEZZE, B. M.; GARCIA, I. N. S.; OLIVEIRA, V. M.; SANTOS NETO, E. V.; MARSAIOLI, A. J. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? **Associação Médica Brasileira Express**, v. 1, p. 47, 2011.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. Mestrado (Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Unidade da USP, Piracicaba, 2002.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology Research International**, v. 1 p. 1-14, 2011.

DAS, P.; YANG, X.-P.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers of Microbiology**, v. 5, p. 696, 2014.

DECESARO, A.; RIGON, M. J.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-54, 2013.

DENSAI, 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, 1999.

DESAI, D.; BANAT, M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-13, 2003.

DUBEAU, D.; DÉZIEL, E.; WOODS, D. E.; LÉPINE, F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiology**, v. 263, p. 1-12, 2009.

EDWARDS, J. R.; HAYASHI, J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 111, p. 415-21, 1965.

FRENA, M. **Estudo da degradação de óleo diesel por diferentes métodos oxidativos e identificação de subprodutos por cromatografia a gás bidimensional abrangente**. 2011. Dissertação (Mestrado em química). 75 f. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2011.

GAYLARDE, C. C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. In: SILVA, C. M. M. S.; ROQUE, M. R.; MELO, I. S. **Microbiologia ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000, 98p.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 373-83, 2013.

GERTLER, C.; NÄTHER, D. J.; CAPPELLO, S.; GERDTS, G.; QUILLIAM, R. S.; YAKIMOV, M. M.; GOLYSHIN, P. N. Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, p. 520-36, 2012.

GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, 2013.

HAMDI, S.; BENZARTI, L.; MANUSADŽIANAS, I.; AOYAMA, N. J. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1926-35, 2007.

HASSAN, M.; ESSAM, T.; YASSIN, A. S.; SALAMA, A. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 573-9, 2016.

HENKEL, M.; MULLER, M. M.; KUGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDAK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-19, 2012.

ITOPF. **Oil tanker spill statistics 2014**. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited, n. January, p. 12, 2015.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-201, 2007.

JARAMILLO, G. E. E.; PABA, G. M.; OSPINO, M. C. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. **Nova: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, v. 8, n. 13, p. 1-120, 2010.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A. Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-6, 1949.

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.

JURELEVICIUS, D.; ALVAREZ, V. M.; PEIXOTO, R.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L. The use of a combination of alkb primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 6, p. 5927-35, 2013.

KAPADIA, S. G.; YAGANIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, n. 4, p. 1-8, 2013.

KIM, J. S.; LEE, I. K.; YUN, B. S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. **PloS One**, v. 10, n. 4, e0122917, 2011.

KIRK, P. W.; DYER, B. J.; NOE, J. Hydrocarbon utilization by higher marine fungi from diverse habitats and localities. **Mycologia**, v. 83, n. 2, p. 227-30, 1991.

KOMA, D. H. F.; CHUNG, S-Y.; KUBO, M. Biodegradation of n-alkylcyclohexanes by co-oxidation via multiple pathways in *Acinetobacter* sp. ODDK71. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 6, p. 641-4, 2003.

KOSARIC, N.; GRAY, N. C. C.; CAIRNS, W. L.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biodurfactan production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 11, p. 1735-43, 1987.

KUMAR, C. G.; MAMIDYALA, S. K.; SUJITHA, P.; MULUKA, H.; AKKENAPALLY, S. Evaluation of critical nutritional parameters and their significance in the production of rhamnolipid biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 6, p. 1507-16, 2012.

LEITE, G. G.; FIGUEIRÔA, J. V.; ALMEIDA, T. C.; VALÕES, J. L.; MARQUES, W. F.; DUARTE, M. D.; GORLACH-LIRA, K. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 262-70, 2016.

LIMA, T. M.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; LEÃO, B. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2957-64, 2011.

LIN, T. C.; PAN, P. T.; YOUNG, C. C.; CHANG, J. S.; CHANG, T. C.; CHENG, S. S. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 9, p. 1487-96, 2011.

LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; CAPELINI, T. L.; EBERLIN, M. N.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids production by a *Pseudomonas aeruginosa* LBI mutant: solutions and homologs characterization. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 51, p. 397-405, 2014.

LUO, C.; LIU, X.; ZHOU, H.; WANG, X.; CHEN, Z. Identification of four NRPS gene clusters in *Bacillus subtilis* 916 for four families of lipopeptides biosynthesis and evaluation of their intricate functions to the typical phenotypic features. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 422-31, 2014.

MAGALHÃES, L. **Avaliação da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos sobre *Listeria monocytogenes***. 2012. Mestrado (Química Orgânica e Biológica). Instituto de Química de São Carlos (USP), São Carlos, 2012.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.

MEDAURA, M. C.; ÉRCOLI, C. E.; Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using apple filter cake. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n. 3, p. 427-32, 2008.

MEDINA, G.; JUÁREZ, K.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-Butyryl-Homoserine Lactone. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 1, p. 377-80, 2003.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008, 647p.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. **Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização surfatantes**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental, 50. 95p. 2008.

MNIF, S.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; SAYADI, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 525-36, 2011.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, p. 4116-33, 2015.

MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAUJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, n. 1, p. 1-13, 2007.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, v. 5, p. 372-8, 2009.

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. 732-46, 2015.

NIE, Y.; CHI, C. Q.; FANG, H.; LIANG, J. L.; LU, S. L.; LAI, G. L.; TANG, Y. Q.; WU, X. L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. **Scientific Reports**, v. 4, article number 4968, 2014.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: Na update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-600, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-6, 2002.

NKWELANG, G.; KAMGA, H. F. L.; NKENG, G. E.; ANTAI, S. P. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro-organisms in tropical soil polluted with oily sludge. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1075-80, 2008.

OLIVEIRA, P. F. L.; VASCONCELLOS, S. P.; ANGOLINI, C. F. F.; CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J.; SANTOS NETO, E. V.; OLIVEIRA, V. M. Taxonomic diversity and biodegradation potential of bacteria isolated from oil reservoirs of an offshore southern brazilian basin. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 132, p. 1-14, 2012.

PACHECO, G. J.; CIAPINA, E. M. P.; GOMES, E. B.; PEREIRA JR, N. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 685-93, 2010.

PAISSE, S. R.; GONI-URRIZA, M.; COULON, F.; DURAN, R. Are alkane hydroxylase genes (*alkB*) relevant to assess petroleum biodegradation processes in chronically polluted coastal sediments? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 835-44, 2011.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-4, 2009.

PENG F.; LIU, Z.; WANG, L.; SHAO Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1603-11, 2007.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamnolipid ointment. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 12, p. 142-6, 2008.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-8, 2009.

PLOCINICZAK, M.; KUKLA, M.; WĄTROBA, R.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9385-95, 2014.

POWELL, S. M.; FERGUSON, S. H.; BOWMAN, J. P.; SNAPE, I. Using real -time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 3, p. 523-32, 2006.

RAHIM, R.; OCHSNER, U. A.; OLVERA, C.; GRANINGER, M.; MESSNER, P.; LAM, J. S.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for dirhamnolipid biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 708-18, 2011.

RAMKRISHNA, S. **Biosurfactants**. Springer Science & Business Media, 2010.

REIS, F. A. S. L.; SERVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Lipopeptide surfactante production by *Bacillus subtilis* grow on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, p. 889-912, 2004.

RODRIGUES, L. R. Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 449, p. 304-16, 2014.

ROJO F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 2477-90, 2009.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34-8, 2014.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005-16, 2013.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. International Biodeterioration & Biodegradation Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 168-77, 2015.

SANTOS, A. C.; BEZERRA, M. S.; PEREIRA, H. S.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 4, p. 27-33, 2010.

SARAFIN, Y.; DONIO, M.B.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M.; CITARASU, T. Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511-9, 2014.

SHAO, Z. Trehalolipids. In: **Biosurfactants from Genes to Application**. Soberon-Chavez G., ed. Berlin: Springer, p. 121-44, 2010.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H.; NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477-82, 2011.

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Techniques**, v. 5, n. 4, p. 265-8, 1991.

SILVA, D. S. P.; CAVALCANTI, D. L.; MELO, E. J. V.; SANTOS, P. N. F.; LUZ, E. L. P.; GUSMAO, N. B.; SOUSA, M. F. V. Q. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 85-9, 2015.

SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006.

SMITS, T. H. M.; BALADA, S. B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1733-42, 2002.

SOBERÓN-CHÁVES, G.; LÉPENE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718-25, 2005.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A. A.; SOUSA, M. F. V. Q. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. In: 3º Congresso Brasileiro de P & D em petróleo e gás. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SOUZA, E. F.; PERES, M. R.; MORAES, S. B. **Seleção de surfactantes para a solubilização e remoção de LNAPLs de águas subterrâneas**. XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. São Paulo, 2008.

SOUZA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; MELOC, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; CRUZ, A. J. G. Cinética e caracterização de rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 431-41, 2014.

THAPA, B.; AJAY KUMAR, K. C.; GHIMIRE, A. A review on bioorremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Journal of Science Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 164-70, 2012.

THAVASI, R.; SHARMA, S.; JAYALAKSHMI, S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, S1:001. doi:10.4172/2157-7463.S1-001, 2011.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, T. C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010-20, 2010.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231-41, 2011.

VIGGOR, S.; JUHANSON, J.; JÕESAAR, M.; MITT, M.; TRUU, J.; VEDLER, E.; HEINARU, A. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. **Microbiological Research**, v. 168, n. 7, p. 415-27, 2013.

VUORINEN, P. J. et al. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 479–487, 2006.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 1-13, 2010.

WANG, W.; SHAO, Z. Genes involved in alkane degradation in the *Alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 437-48, 2013.

WANG, X. B.; NIE, Y.; TANG, Y. Q.; WU, G.; WU, X, L. n-Alkane chain length alters *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1b biosurfactant production and cell surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 400-2, 2013.

WASZAK, D. Q.; CUNHA, A. C. B.; AGARRALLUA, M. R. A.; GOEBEL, C. S.; SAMPAIO, C. H. Bioremediation of a Benzo[a]Pyrene-Contaminated soil using a microbial consortium with *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, and *Fusarium sp.* **Water, Air and Soil Pollution**, v. 21, p. 226-319, 2015.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biorremediação Microbiana e seu potencial na degradação de compostos de petróleo. **Revista Água e Meio Ambiente Subterrâneo**, v. 7, p. 32-3, 2014.

WIGNESWARAN, V.; NIELSEN, K. F.; STERNBERG, C.; JENSEN, P. R.; FOLKESSON, A.; JELSBÄK, L. Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 181, p. 1-13, 2016.

WILSON, S. C.; JONES, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Environmental Pollution**. V. 81, p. 229– 49, 1993.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; K.; NAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339-47. 2004.