



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Sheila Simone Kerber

**Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com  
BTX (benzeno, tolueno e xileno)**

Florianópolis  
2020

Sheila Simone Kerber

**Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com  
BTX (benzeno, tolueno e xileno)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia e Biociências.  
Orientador: Prof. Dr. Admir José Giachini  
Coorientador: Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte

Florianópolis  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kerber, Sheila Simone

Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com BTX (benzeno, tolueno e xileno) / Sheila Simone Kerber ; orientador, Admir José Giachini, coorientador, Rubens Tadeu Delgado Duarte, 2020.

75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biorremediação. 3. Biodegradação. 4. Hidrocarbonetos monoaromáticos. 5. BTX. I. José Giachini, Admir. II. Tadeu Delgado Duarte, Rubens. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Sheila Simone Kerber

**Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com  
BTX (benzeno, tolueno e xileno)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Diogo Robl, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Manuela Balen, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de “Mestre em Biotecnologia e Biociências” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

---

Prof. Glauber Wagner, Dr.

Coordenador do Programa

---

Prof. Admir José Giachini, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

À sociedade brasileira, trabalhadora e financiadora do ensino público gratuito e de qualidade;

À CAPES, pela bolsa concedida;

À PETROBRAS, pelo financiamento da pesquisa;

À Universidade Federal de Santa Catarina e seus servidores, por contribuir com minha formação profissional e pessoal desde longa data;

À equipe do LAMEB e Central de Análises da Engenharia Química, por sua disponibilidade e auxílio frente as diferentes análises desenvolvidas no decorrer da pesquisa;

Ao professor Carlos R. Z. Blades, pelo empréstimo de equipamento, quando necessário;

Ao professor Admir J. Giachini, pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica, por aceitar me orientar e por sempre estar de portas abertas para me receber no laboratório, desde os tempos da graduação em Ciências Biológicas;

Ao professor Rubens T. D. Duarte, também por aceitar me orientar, mas principalmente por ser este “paizão” para todos os seus alunos, sempre ensinando com muita paciência e dedicação;

Aos colegas do REMA, em especial à Marilda Fernandes e Manuela Balen, pelo auxílio nas atividades lá desenvolvidas, e por sua paciência e apoio diante das dificuldades enfrentadas;

Aos bolsistas do REMA, em especial à Manuzinha, Jaqueline e João, que por diversas vezes me auxiliaram em atividades de bancada;

Ao Thiago Fossile, pela elaboração do mapa apresentado no trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório de Diversidade Microbiana, em especial à Paola, pelos cafés e conversas agradáveis; ao Lander, pelos chimarrões e caronas compartilhadas, geralmente em meio a risadas; e ao André, por facilitar meu trabalho em muitos aspectos;

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Molecular e Extremófilos, em especial à Joana, por sua amizade e por toda ajuda fornecida sempre que necessário; à Bruna, pelos ensinamentos sobre biologia molecular, pela amizade e bons momentos no laboratório; à Marianne, por auxiliar quando precisei e contribuir para a revisão textual deste trabalho; e à Mariana G., por ser sempre tão querida e empática;

Às minhas amadas amigas Priscila B. Delben, Carla S. Rosa, Palloma Paredes e Jéssica Hasse, pelo imenso carinho e apoio emocional constante. Vocês sempre tornaram meus dias mais felizes, não importa o que tenha acontecido!

Aos demais amigos, pela sua presença e apoio ao longo do tempo, em especial à Leandra, Sayonara, Aline e Edenilson.

Ao Lenoir Zamboni, meu amigo e companheiro por tantos anos. Obrigada por sua paciência, incentivo e compreensão ao longo desta fase, assim como em tantas outras!

Finalmente, à minha família, principalmente aos meus pais, Adelar Kerber e Clarisse C. M. Kerber, pela educação e amor que sempre deram, e pelo exemplo de persistência que representam.

A todos vocês, MUITO OBRIGADA!

*Inspiration does exist, but it has to find you working.*

PABLO PICASSO

## RESUMO

O petróleo é fonte de importantes produtos comerciais, com destaque para os combustíveis. No entanto, por conter compostos muitas vezes prejudiciais ao ambiente e a saúde humana, contaminações por petróleo e seus derivados são motivo de grande preocupação. Dentre seus componentes, tem destaque os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno, genericamente conhecidos por BTX. Além de altamente tóxicos, compostos BTX apresentam elevada solubilidade em água, em comparação com os demais hidrocarbonetos do petróleo, o que gera grande preocupação quanto ao risco de contaminação de lençóis freáticos. Uma vez ocorrida uma contaminação de natureza petroquímica, faz-se necessária a utilização de medidas remediadoras que reduzam seus impactos. A biorremediação baseada no uso de microrganismos vem sendo cada vez mais estudada para este fim devido ao seu baixo custo em comparação com processos tradicionais, além da possibilidade de completa degradação do contaminante. Assim como outros derivados de petróleo, BTX podem ser degradados por microrganismos, com destaque para as bactérias, o que em alguns casos pode estar associado a produção de biossurfactantes. Estas substâncias contribuem para aumentar a disponibilização do substrato à ação microbiana, e sua presença é um bom indicativo do potencial de degradação de hidrocarbonetos. Considerando o exposto, este trabalho buscou isolar bactérias a partir de amostras de água subterrânea provenientes de área contaminada por uma mistura de óleo diesel (80%) e biodiesel (20%), avaliar seu crescimento em meio mínimo contendo BTX, e testar qualitativamente sua capacidade de produção de biossurfactantes. A partir do enriquecimento das amostras com BTX foram isoladas 10 linhagens bacterianas, das quais 8 foram identificadas por meio de sequenciamento de parte do gene RNAr 16S, sendo 4 *Bacillus* spp., 2 *Staphylococcus* spp., 1 *Leifsonia* sp. e 1 *Brevibacillus reuszeri*. Exceto por *B. reuszeri*, todos os isolados apresentaram células viáveis após 10 e 30 dias de incubação em BTX, indicando boa tolerância aos contaminantes. Três isolados apresentaram resultados positivos em relação a produção de biossurfactantes, dois por meio da produção de emulsão e um pela redução da tensão superficial do meio de cultura. Por meio do teste IE24, obteve-se 43% de emulsão por B3(3m) (não identificado) e 63% por T1(2m) (*Bacillus* sp.). Após uma semana de cultivo em meio suplementado com 1% de caldo nutriente, B1(3m) (não identificado) reduziu a tensão superficial do meio de 55 mN•m<sup>-1</sup> para 34,70 mN•m<sup>-1</sup>. Os resultados encontrados provam que a área contaminada possui bactérias com características favoráveis a biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo, mas a confirmação de sua capacidade em degradar BTX requer outros estudos, preferencialmente baseados na quantificação dos contaminantes.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Biodegradação. Hidrocarbonetos monoaromáticos.

## ABSTRACT

Petroleum is a source of important commercial products, with emphasis on fuels. However, because it contains compounds that are often harmful to the environment and human health, contamination by oil and its derivatives is of great concern. Among its components, the monoaromatic hydrocarbons benzene, toluene and xylene stand out, generally known as BTX. In addition to being highly toxic, BTX compounds have high water solubility compared to other oil hydrocarbons, which raises great concern about the risk of contamination of groundwater. Once contamination of a petrochemical nature has occurred, it is necessary to use remedial measures to reduce its impacts. Bioremediation based on the use of microorganisms has been increasingly studied for this purpose due to its low cost compared to traditional processes, in addition to the possibility of complete degradation of the contaminant. Like other petroleum products, BTX can be degraded by microorganisms, especially bacteria, which in some cases may be associated with the production of biosurfactants. These substances contribute to increase the availability of the substrate for microbial action, and their presence is a good indicator of the potential for hydrocarbon degradation. Considering the above, this work sought to isolate bacteria from groundwater samples from an area contaminated by a mixture of diesel oil (80%) and biodiesel (20%), evaluate their growth in a minimum medium containing BTX, and qualitatively test their capacity for producing biosurfactants. From the enrichment of the samples with BTX, 10 bacterial strains were isolated, of which 8 were identified by sequencing part of the 16S RNAr gene, being 4 *Bacillus* spp., 2 *Staphylococcus* spp., 1 *Leifsonia* sp. and 1 *Brevibacillus reuszeri*. Except for *B. reuszeri*, all isolates showed viable cells after 10 and 30 days of incubation in BTX, indicating good tolerance to these contaminants. Three isolates showed positive results related to the production of biosurfactants, two through the production of emulsion and one by reducing the surface tension of the culture medium. Through the IE24 test, 43% emulsion was obtained for B3(3m) (not identified) and 63% for T1(2m) (*Bacillus* sp.). After a week of cultivation in medium supplemented with 1% of nutrient broth, B1(3m) (not identified) reduced the surface tension of the medium from 55 mN•m<sup>-1</sup> to 34.70 mN•m<sup>-1</sup>. The results found prove that the contaminated area has bacteria with characteristics favorable to the biodegradation of petroleum-derived hydrocarbons, but confirmation of its ability to degrade BTX requires further studies, preferably based on the quantification of contaminants.

**Keywords:** Bioremediation. Biodegradation. Monoaromatic hydrocarbons.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação química estrutural dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e isômeros de xileno .....	18
Figura 2 – Representação de um biossurfactante .....	33
Figura 3 – Fluxograma resumido da metodologia utilizada na pesquisa .....	36
Figura 4 – Mapa indicando a localização do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA).....	37
Figura 5 – Esquema geral do experimento de enriquecimento utilizado para o isolamento de bactérias .....	38
Figura 6 – Fotografia dos frascos de penicilina lacrados utilizados para o cultivo na presença de BTX.....	42
Figura 7 – Representação geral do método da gota utilizado para monitorar o crescimento dos isolados na presença de BTX.....	43
Figura 8 – Dendrograma e perfil de bandas das eletroforeses referente aos doze isolados obtidos a partir do enriquecimento das amostras com BTX.....	47
Figura 9 – Gráfico mostrando a relação entre o número de UFC/mL e os tempos de monitoramento na presença de BTX dos diferentes isolados.....	48
Figura 10 – Gráfico mostrando a classificação dos isolados com relação ao desempenho durante o cultivo em BTX .....	49
Figura 11 – Registro fotográfico dos isolados com resultado positivo no teste de deslocamento de óleo.....	50
Figura 12 – Registro fotográfico dos isolados com resultado positivo no teste IE24 .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores orientadores da concentração de benzeno, tolueno e xilenos para solos e águas subterrâneas de acordo com a Resolução CONAMA 420/2009 .....	22
Tabela 2 – Revisão da literatura sobre as principais espécies de bactérias encontradas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados .....	25
Tabela 3 – Número de isolados obtidos a partir do enriquecimento com BTX considerando o contaminante utilizado no enriquecimento e a amostra de origem.....	46
Tabela 4 – Identificação genética dos isolados por meio de sequenciamento de fragmento do gene RNAr 16S.....	47
Tabela 5 – Diferença no número de UFC/mL entre 10 dias (T5) e 30 dias (T6) de cultivo na presença de BTX e respectiva classificação dos isolados .....	49
Tabela 6 – Valores médios de tensão superficial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) obtidos a partir do cultivo em meio mínimo com 1% de óleo de soja e 1% de glicose.....	52
Tabela 7 – Valor médio de tensão superficial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) obtido a partir do cultivo do isolado B1(3m) em meio mínimo com 1% de óleo de soja e 1% de caldo nutriente.....	52
Tabela 8 – Síntese dos resultados obtidos considerando todos os experimentos realizados ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
dMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DO	Densidade óptica
HC	Hidrocarbonetos
HPA	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
MEOR	<i>Microbial enhanced oil recovery</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
REMA	Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
TAE	Tris acetato-EDTA
TPH	<i>Total Petroleum Hydrocarbons</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo geral .....	17
2.2	Objetivos específicos .....	17
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>17</b>
3.1	Caracterização química do benzeno, tolueno e xileno.....	17
3.2	Biorremediação.....	19
3.3	Legislação Relacionada aos BTX.....	21
3.4	Prospecção de Microrganismos degradadores de BTX.....	21
3.5	Fatores que afetam a biodegradação de BTX .....	24
3.5.1	Fatores físico-químicos.....	27
3.5.1.1	<i>Disponibilidade de doadores e aceptores de elétrons</i> .....	27
3.5.1.2	<i>Tipo e concentração do contaminante</i> .....	27
3.5.1.3	<i>Nutrientes</i> .....	29
3.5.1.4	<i>Potencial Hidrogeniônico (pH)</i> .....	29
3.5.1.5	<i>Temperatura</i> .....	29
3.5.1.6	<i>Disponibilidade de água</i> .....	30
3.5.2	Fatores biológicos .....	30
3.5.2.1	<i>Culturas puras versus mistas</i> .....	30
3.5.2.2	<i>Metabolismo bacteriano</i> .....	31
3.5.2.3	<i>Produção de biossurfactantes</i> .....	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.1	Isolamento de linhagens em meio de cultura enriquecido com BTX.....	37
4.1.1	Amostras .....	37
4.1.2	Técnica de isolamento .....	38
4.1.3	Seleção e caracterização molecular dos isolados por BOX-PCR.....	39
4.2	Identificação das espécies .....	40
4.3	Avaliação do crescimento na presença de BTX .....	41
4.3.1	Preparo do inóculo .....	41
4.3.2	Cultivo em BTX .....	42

4.3.3	Monitoramento do crescimento bacteriano.....	42
4.4	Avaliação da produção de biossurfactantes .....	44
4.4.1	Cultivo para estimular a produção de biossurfactantes .....	44
4.4.2	Testes utilizados.....	44
4.4.2.1	<i>Atividade de deslocamento de óleo</i> .....	44
4.4.2.2	<i>Índice de Emulsificação IE24</i> .....	45
4.4.2.3	<i>Mensuração da tensão superficial</i> .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1	Isolados selecionados.....	46
5.1.1	Isolados obtidos a partir do enriquecimento com BTX.....	46
5.1.2	Triagem genética dos isolados (BOX-PCR).....	46
5.2	Identificação das espécies.....	46
5.3	Avaliação do crescimento dos isolados na presença de BTX.....	48
5.4	Produção de biossurfactantes.....	50
5.4.1	Atividade de deslocamento de óleo .....	50
5.4.2	Índice de emulsificação IE24.....	51
5.4.3	Mensuração da tensão superficial .....	51
5.5	Síntese dos resultados .....	52
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>64</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>66</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O petróleo é fonte de importantes produtos comerciais, com destaque para os combustíveis fósseis. Formado há milhares de anos por meio da decomposição de seres vivos, o petróleo é constituído de milhares de substâncias orgânicas distintas, muitas das quais são tóxicas ao ambiente e à saúde humana. As características e composição do petróleo são bastante variáveis, a depender de sua fonte de origem. Quimicamente, os elementos encontrados no óleo cru são moléculas de carbono e hidrogênio (84-87% e 11-14% em peso, respectivamente), e em menor quantidade enxofre, nitrogênio e oxigênio (0,06-2%, 0,1-2,0% e 0,1-2,0% em peso, respectivamente) (McCAIN, 1989).

Dentre os componentes encontrados no petróleo, assim como em muitos de seus derivados, têm destaque os hidrocarbonetos (HC) monoaromáticos benzeno, tolueno e xilenos, genericamente conhecidos por BTX (ICSS, 2006). Estes compostos podem consistir, em peso, em até 45% dos componentes da gasolina e até 12% do óleo diesel (SEABRA, 2008), e geram grande preocupação devido à suas propriedades carcinogênicas e depressoras do sistema nervoso central (TEIXEIRA, 2007). Ainda, estes compostos são mais solúveis em água que outros HC presentes no petróleo, sendo, portanto, mais facilmente dispersos no ambiente e considerados potenciais contaminantes de lençóis freáticos (LEE et al., 2002).

A importância da indústria petrolífera durante o século XX, tanto industrial quanto econômica, tem gerado grande preocupação quanto aos casos de contaminação de solos e águas subterrâneas a partir de derivados de petróleo (BRITO et al., 2010). Contaminações podem ser oriundas de diferentes fontes ao longo de sua cadeia produtiva (VAN HAMME et al., 2003), a qual é genericamente dividida nas fases de extração, refino, transporte e comercialização (SEABRA, 2008). A extração de petróleo normalmente é realizada *offshore* (em alto mar), mas pode ser também *onshore* (continental), sendo ambas importantes fontes de contaminação em seus respectivos ambientes (ATLAS & HAZEN, 2011).

Pelo menos 40% do petróleo consumido mundialmente é transportado pelos oceanos (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013). Existem diversos exemplos de grandes acidentes envolvendo derramamentos de petróleo, afetando ecossistemas por todo o planeta. Dentre os registros mais alarmantes está o vazamento do superpetroleiro *Exxon Valdez*, no Alasca, em 1989; do petroleiro *Jessica*, nas Ilhas Galápagos, em 2001; e da plataforma *DeepWater Horizon*, no Golfo do México, em 2010, todos envolvendo o derrame de milhares de litros de petróleo em alto mar (ATLAS & HAZEN, 2011).

Em âmbito nacional, destacam-se dois vazamentos de grande magnitude registrados no ano 2000. No primeiro deles, ocorrido em janeiro, 1,3 milhões de litros de óleo cru foram escoados por meio de uma tubulação em direção à Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro (CIOTTI et al., 2009). No segundo caso, ocorrido em julho, cerca de 4 milhões de litros de petróleo vazaram de um oleoduto, culminando na contaminação da bacia do Arroio Saldanha, no município de Araucária, evento caracterizado como um dos maiores desastres ambientais do Paraná (MELO et al., 2003). Em episódio mais recente, há ainda o caso do vazamento em alto mar em 2019 que causou a contaminação de pelo menos 980 pontos ao longo de nove estados nordestinos, além de praias situadas no Espírito Santo e Rio de Janeiro (NASCIMENTO, 2019).

O Brasil possui ampla estrutura voltada à indústria do petróleo, e vazamentos em solo também constituem problemas de grande preocupação. Em 2018 o país possuía 334 áreas de exploração (146 em mar; 188 em terra), além de outras 457 áreas em fases de produção de derivados, ou em desenvolvimento para a produção. Além disso, o Brasil conta com dutos de transporte de petróleo que perfazem 1.844 km de extensão, 296 bases de distribuição de combustíveis líquidos, e 40.021 postos revendedores de combustíveis automotivos (ANP, 2019). Postos de combustíveis e estabelecimentos de revenda de derivados de petróleo estão entre os principais alvos em relação à acidentes ambientais, principalmente por estarem localizados em áreas urbanas com elevada concentração de pessoas (GOUVEIA & NARDOCCI, 2007).

É importante frisar que acidentes de grande magnitude são relativamente raros, porém pequenos vazamentos são frequentes (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013). Considerando a toxicidade dos compostos existentes no petróleo, mesmo contaminações de menor escala são consideradas preocupantes (ADAMS et al., 2015). Além disso, tratando-se de combustíveis, devido a grande parte dos tanques de armazenamento encontrar-se no subsolo, há considerável dificuldade no monitoramento e controle de vazamentos (BRITO et al., 2010).

Uma vez ocorrida uma contaminação de natureza petroquímica, faz-se necessária a utilização de medidas remediadoras que minimizem seus impactos, as quais podem ser de natureza química, física ou biológica (PEIXOTO et al., 2008). Este último caso, referido na literatura como biorremediação, refere-se as técnicas que utilizam seres vivos, tais como microrganismos ou vegetais, a fim de reduzir e/ou eliminar os efeitos negativos gerados por certos poluentes à saúde humana e ao meio ambiente (SEABRA, 2008). As bactérias se destacam para uso na biorremediação de HC de petróleo, dentre outras razões, pela

possibilidade de algumas espécies de produzir biossurfactantes, moléculas que facilitam a solubilização de substratos na água (BENTO et al., 2008).

Nos últimos anos, a demanda por processos de remediação vem aumentando, exigindo cada vez mais estudos a fim de melhor conhecer a diversidade microbiana de diferentes ecossistemas, a função de cada microrganismo na metabolização dos contaminantes, assim como a definição de vias e consórcios microbianos que possam ser utilizados para tais finalidades (WETLER-TONINI et al., 2011). Considerando esta demanda, este trabalho propõe o isolamento e identificação de bactérias com potencial de biodegradar benzeno, tolueno e xileno a partir de amostras de água subterrânea previamente contaminadas com óleo diesel.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Isolar linhagens bacterianas e avaliar seu potencial para emprego em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas com BTX.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Isolar linhagens bacterianas por meio do enriquecimento de amostras com BTX;
2. Identificar geneticamente as espécies por meio do sequenciamento de parte do gene RNAr 16S;
3. Avaliar o crescimento dos isolados na presença de BTX em microcosmo em meio de cultura líquido;
4. Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes pelos isolados por meio de testes qualitativos e mensuração da tensão superficial.

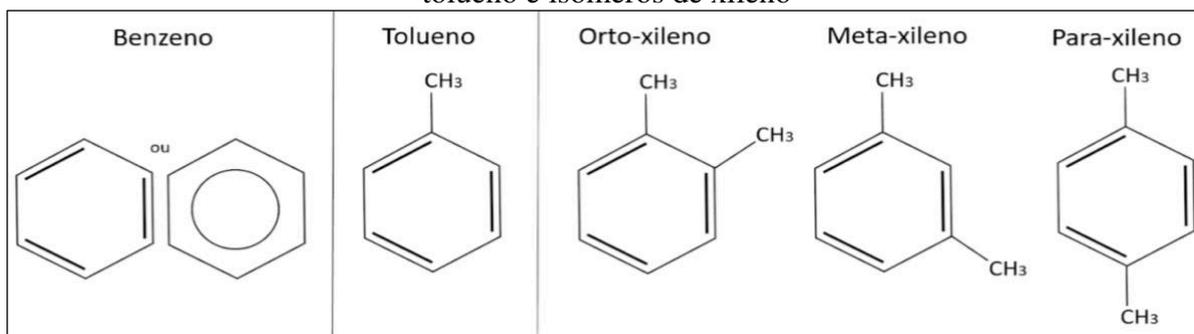
## **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1 Caracterização química do benzeno, tolueno e xileno**

Compostos BTX são classificados como hidrocarbonetos monoaromáticos por possuírem um único anel aromático, sendo o benzeno sua unidade básica. Estruturalmente, os BTX são formados por seis átomos de carbono organizados em um anel hexagonal altamente

estável. Diferentemente do benzeno, que possui um anel aromático sem grupos laterais, o tolueno e os xilenos possuem um e dois grupos metis, respectivamente, ligados ao anel. A posição dos grupos metis diferencia os três isômeros de xileno em *orto*-, *meta*- e *para*-xileno (Figura 1) (McCain, 1989; TEIXEIRA, 2007).

Figura 1 – Representação química estrutural dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e isômeros de xileno



Fonte: Adaptado de McCain (1989).

Compostos aromáticos são poluentes de grande preocupação, principalmente devido à sua persistência no ambiente graças à alta estabilidade do benzeno (DÍAZ, 2004; CAO et al., 2009; PRAKASH et al., 2014). Além de tóxicos mesmo sob baixas concentrações (CAO et al., 2009), os BTX são conhecidos como poluentes ambientais primários, uma vez que possuem atividade mutagênica, carcinogênica e depressora do sistema nervoso central (CAO et al., 2009; BRITO et al., 2010), e sob exposições crônicas têm sido associados ao desenvolvimento de leucemia (TEIXEIRA, 2007).

BTX são constituintes comuns de contaminações envolvendo petróleo e combustíveis derivados (LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008; CAO et al., 2009), sendo o benzeno o composto de maior preocupação (MARIANO, 2006; TEIXEIRA, 2007; CAO et al., 2009). Por se tratar de compostos de baixo peso molecular, os BTX são altamente voláteis (ATLAS, 1995). De fato, dentre os componentes da gasolina, são os de maior volatilidade (KAPLAN et al., 1997). Quanto a solubilidade em água, o benzeno é o mais solúvel, seguido do tolueno e xilenos, os quais apresentam coeficiente de solubilidade de 1760 mg/L, 532 mg/L e 163–185 mg/L, respectivamente (WATTS et al., 2000).

Devido a sua relativa elevada solubilidade (em comparação com outros HC), os BTX têm grande potencial de alcance de lençóis freáticos (OH et al., 1994; MARIANO, 2006; ABURTO & PEIMBERT, 2011), característica que também facilita sua dispersão para regiões além da fonte de contaminação (LEE et al., 2002). No Brasil, um agravante desta problemática

é a adição de 22% de etanol à gasolina, que contribui tanto para o aumento da solubilidade de BTX na água, quanto para o atraso de sua degradação biológica (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; SANTOS, 1996; TEIXEIRA, 2007).

### 3.2 Biorremediação

Uma área contaminada pode ser remediada a partir de processos químicos, físicos ou biológicos. Estes normalmente são utilizados em conjunto, pois assim apresentam melhores resultados na depuração dos contaminantes em comparação com o uso de técnicas isoladas (PEIXOTO et al., 2008). Tratando-se da biorremediação, diferentes seres vivos podem ser utilizados na expectativa de metabolizar determinado contaminante, visando sua eliminação do ambiente ou transformação em compostos menos tóxicos (ADAMS et al., 2015).

A biorremediação refere-se à geração de energia por microrganismos a partir de reações de oxirredução (ADAMS et al., 2015). Tais processos podem ocorrer de maneira aeróbia ou anaeróbia (TEIXEIRA, 2007) e podem levar à completa mineralização do poluente, transformando-o em gás carbônico, água e biomassa (MARIANO, 2006). Embora diversos seres vivos possam ser empregados em tratamentos de biorremediação, as bactérias costumam ser o grupo mais estudado e utilizado (DÍAZ, 2004), destacando-se por apresentar velocidades metabólicas mais elevadas que os demais organismos (SELVAKUMAR et al., 2014).

Uma estratégia de biorremediação bastante citada é a atenuação natural monitorada, na qual não há interferência humana, pressupondo-se que o ambiente, com sua comunidade intrínseca, seja capaz de restaurar o ambiente contaminado. Neste caso, a área é monitorada regularmente a fim de se avaliar o progresso da biorremediação (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; ICSS, 2006).

Em casos onde há intervenção humana, diversas técnicas podem ser empregadas, as quais podem ser aplicadas *in situ* (no próprio local contaminado) ou *ex situ* (em local diferente da área originalmente contaminada) (ICSS, 2006; PEIXOTO et al., 2008; ADAMS et al., 2015). Técnicas *in situ* costumam ser mais econômicas e seguras, uma vez que não há necessidade de remoção nem transporte do material contaminado (PEREIRA JR. et al., 2009; ANDRADE et al., 2010). Além disso, representam menor risco ambiental que métodos baseados em processos físicos e químicos (WETLER-TONINI et al., 2010) e possuem potencial para eliminar permanentemente os contaminantes (BOOPATHY, 2000; SABATÉ et al., 2004).

Técnicas de biorremediação possuem duas grandes vertentes: a bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos capazes de degradar os poluentes na área contaminada; e a bioestimulação, que visa corrigir algum fator limitante do crescimento microbiano local (ADAMS et al., 2015).

Na bioaugmentação, realiza-se a introdução de microrganismos na área contaminada a fim de aumentar sua densidade. Esta técnica é indicada quando o ambiente a ser remediado não possui microrganismos aptos à biodegradação, ou os possui em quantidade reduzida (MARIANO, 2006; ADAMS et al., 2015). Quando se decide pela bioaugmentação, recomenda-se o uso de microrganismos isolados da própria área contaminada, a chamada comunidade autóctone, uma vez que estes já estão adaptados ao ambiente (GALLEGO et al., 2001; BENTO et al., 2003; PRAKASH et al., 2014; ADAMS et al., 2015). No entanto, caso a comunidade autóctone se mostre incapaz de degradar os contaminantes, é possível que microrganismos exógenos sejam inseridos no local (LEAHY & COLWELL, 1990; ABURTO & PEIMBERT, 2011).

Na bioestimulação, por outro lado, são feitas intervenções que visam estimular a proliferação de microrganismos nativos da área. Estas intervenções podem envolver o ajuste da umidade do solo, correção do pH, adição de nutrientes, ou aeração (ICSS, 2006; PEIXOTO et al., 2008). Bastante comum no emprego da bioestimulação é a adição de nitrogênio, fósforo e/ou potássio ao meio a fim de sustentar a proliferação microbiana (ADAMS et al., 2015). Há ainda a possibilidade de adição de resíduos industriais como bioestimulantes da comunidade microbiológica. Este tipo de intervenção, no entanto, requer cuidados redobrados, uma vez que os resíduos podem atuar como uma fonte adicional de poluição. Por isso, aconselha-se que seu emprego seja realizado apenas em técnicas *ex situ* (MARIANO, 2006).

Estratégias de biorremediação podem ser utilizadas individualmente, porém sua associação geralmente apresenta melhores resultados (ADAMS et al., 2015). Independentemente da técnica escolhida, a promoção de medidas que garantam a sobrevivência da microbiota nativa é fundamental (MARIANO, 2006). Vale reforçar que a biorremediação microbiológica apresenta vantagens econômicas e ecológicas superiores às demais técnicas (ICSS, 2006; MELO & AZEVEDO, 2008), dentre as quais destacam-se a possibilidade de sua realização no próprio local contaminado, a geração de poucos distúrbios no ambiente e, principalmente, o potencial para completa eliminação do contaminante (BOOPATHY, 2000; SABATÉ et al., 2004).

### 3.3 Legislação relacionada aos BTX

A partir da década de 70 o Brasil passou por grande desenvolvimento econômico e industrial, exigindo-se maior estrutura de toda a cadeia produtiva do petróleo. Este crescimento foi acompanhado de preocupações relacionadas à contaminação de solos e águas a partir de vazamentos decorrentes dessas atividades (MARIANO, 2006). De acordo com a Resolução CONAMA nº 273, de 29 de novembro de 2000,

toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais (CONAMA, 2000).

Em relação à casos de contaminação, no Brasil, o órgão de referência é a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Criada em 1968 sob a titulação inicial de Centro Tecnológico de Saneamento Básico, a nova CETESB passou a ser regulamentada mais tarde pela Lei 13.542, de 08 de maio de 2009, cuja preocupação primeira está voltada à preservação e recuperação da qualidade da água, ar e solo (CETESB, 2019). Embora a CETESB atue no registro e atendimento de casos de acidentes envolvendo combustíveis desde 1983 (SILPBORGHS, 1997), os primeiros regulamentos sobre níveis de contaminantes aceitáveis no solo e água foram criados apenas a partir do ano 2000 (SEABRA, 2008).

Atualmente, a legislação que contempla os valores orientadores de qualidade do solo e da água em relação à presença de substâncias químicas é a Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009, a qual apresenta uma série de substâncias, incluindo compostos inorgânicos, hidrocarbonetos aromáticos voláteis, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas, entre outros. Os valores orientadores de qualidade da água em relação aos compostos BTX encontram-se na Tabela 1, e representam os limites acima dos quais há riscos potenciais à saúde humana (segundo a resolução).

### 3.4 Prospecção de microrganismos degradadores de BTX

A prospecção nada mais é do que a exploração, a partir da diversidade viva existente num dado local, em busca de produtos e/ou organismos que possam ser utilizados na indústria ou na remoção de poluentes ambientais (PEIXOTO et al., 2008). Na prospecção de microrganismos capazes de degradar BTX, grande parte das espécies identificadas foram isoladas a partir de locais contaminados (CAO et al., 2009). Nestas áreas há maior probabilidade

de encontrar espécies biodegradadoras porque, após o evento de contaminação, as novas condições impostas no ambiente selecionam os microrganismos que melhor se adaptam na presença do contaminante (TEIXEIRA, 2007; MELO & AZEVEDO, 2008; ABURTO & PEIMBERT, 2011; ADAMS et al., 2015).

Tabela 1 – Valores orientadores da concentração de benzeno, tolueno e xilenos para solos e águas subterrâneas de acordo com a Resolução CONAMA 420/2009

Substância	Solo (mg•Kg <sup>-1</sup> de peso seco)			Água subterrânea (µg•L <sup>-1</sup> )	
	Valor de Prevenção	Agrícola APmax*	Residencial Industrial		
Benzeno	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Tolueno	0,14	30	30	75	700
Xilenos	0,13	25	30	70	500

Valor de prevenção: concentração limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais de acordo com o art. 3º desta Resolução.

\*APmax = área de proteção máxima.

Fonte: adaptado da Resolução CONAMA nº 420/2009.

A exposição prévia da microbiota a determinado poluente, seja de maneira natural ou antropogênica, possui grande influência no tempo necessário à sua degradação em eventos de contaminação subsequentes. Comunidades com histórico de contaminação tendem a ser mais adaptadas à biodegradação, e apresentam maior taxa de degradação em comparação com comunidades sem contaminação prévia (LEAHY & COLWELL, 1990). Além disso, quanto maior o tempo de contaminação, maior a chance de encontrar microrganismos biodegradadores tanto em quantidade quanto em diversidade (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013).

No acidente do *Exxon Valdez* (1989), por exemplo, cerca de 42 milhões de litros de óleo cru foram despejados no mar. Análises realizadas no local demonstraram que a população bacteriana com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo subiu de 1 – 10 % nos primeiros testes para aproximadamente 40 % ao final do ano do acidente (ATLAS & HAZEN, 2011). Outra área bastante estudada na busca por microrganismos biodegradadores é o Golfo do México, onde em 2010 ocorreu o derrame de aproximadamente 780 milhões de litros de óleo. Após o acidente foram identificados 62 filos de bactérias junto às fontes de contaminação, demonstrando a ampla diversidade de microrganismos associados à ambientes contaminados. Além disso, devido a ocorrência de vazamentos naturais e inúmeras perfurações realizadas na busca por petróleo, o Golfo do México provavelmente é um dos locais do planeta que mais contém microrganismos adaptados à degradação de petróleo e derivados (ATLAS & HAZEN, 2011).

Conforme aponta a literatura, qualquer ambiente contaminado com dado poluente pode conter microrganismos capazes de metabolizá-lo (TEIXEIRA, 2007; MELO & AZEVEDO, 2008), embora isso dependa do tempo de contaminação (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013) e da complexidade do contaminante (VAN HAMME et al., 2003; ICSS, 2006). Microrganismos estão amplamente distribuídos no ambiente (VAN HAMME et al., 2003; ATLAS & HAZEN, 2011), podem ser encontrados tanto no solo quanto na água (BRITO et al., 2010), e vêm sendo estudados quanto ao seu potencial biodegradativo desde os anos 1960 (ICSS, 2006).

Experimentos para seleção de microrganismos biodegradadores tipicamente partem do enriquecimento de culturas com o composto de interesse, seguido de seu isolamento em cultura pura e finalmente, cultivo na presença do contaminante como única fonte de carbono (TEIXEIRA, 2007; MELO & AZEVEDO, 2008). No caso dos BTX, estudos de biodegradação bacteriana normalmente são feitos em microcosmos em meio mínimo (LEE et al., 1994; OTENIO et al., 2005; TEIXEIRA, 2007; PRAKASH et al., 2014), sendo os BTX fornecidos em concentrações e combinações variadas (ARVIN et al., 1989; OH et al., 1994; ICSS, 2006; OTENIO et al., 2005; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008). Recomenda-se que o cultivo seja feito em recipientes de vidro que possam ser efetivamente vedados, tais como frascos tipo penicilina, a fim de evitar perdas dos compostos por volatilização (OH et al., 1994; TEIXEIRA, 2007; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008). Recomenda-se também deixar uma maior proporção de ar no frasco em relação ao volume de cultura, evitando condições anóxicas (LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008; SHADI et al., 2013), uma vez que a maioria das vias de biodegradação de compostos monoaromáticos é dependente de oxigênio (VENOSA et al., 2002; CAO et al., 2009).

A identificação de espécies biodegradadoras pode ser feita com base em características morfológicas e/ou testes bioquímicos (OH et al., 1994; RICHARD & VOGEL, 1999; GALLEGO et al., 2001; ABIOYE et al., 2012; UDGIRE et al., 2015). Porém, nos últimos anos, o aprimoramento de técnicas de biologia molecular e de sequenciamento do material genético facilitou a identificação, tanto em quantidade de espécies quanto em acurácia (BERRY & GUTIERREZ, 2017). Frequentemente, a identificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo é feita por meio da amplificação e sequenciamento parcial de genes da subunidade 16S do RNA ribossômico (BENTO et al., 2003; TEIXEIRA, 2007; CERQUEIRA et al., 2011; PRAKASH et al., 2014; PATOWARY et al., 2016; OYETIBO et al., 2017; LIMA et al., 2018). Diversos *primers* podem ser utilizados para esta finalidade, sendo

citados com frequência os *primers* 27F e 1492R (MORALES, 2008; OYETIBO et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Dentre as espécies mais citadas quanto à degradação de compostos aromáticos, tem destaque os gêneros *Acinetobacter*, *Nocardia*, e principalmente *Pseudomonas*, todos utilizando metabolismo aeróbico (CAO et al., 2009). Uma breve revisão das espécies descritas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados é apresentada na Tabela 2. É importante mencionar que os dados descritos na literatura sobre microrganismos biodegradadores podem variar, uma vez que diferentes metodologias são empregadas (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013).

### **3.5 Fatores que afetam a biodegradação de BTX**

Independente do meio, uma estratégia de remediação bem-sucedida deve providenciar as condições ótimas necessárias à degradação do contaminante. Neste sentido, é de fundamental importância conhecer as reações de degradação envolvidas, assim como quais fatores a influenciam e de que maneira (ICSS, 2006). De modo geral, para que um contaminante seja biodegradado, três requisitos básicos devem ser satisfeitos: (1) a presença no ambiente de um organismo capaz de metabolizar o poluente; (2) um estímulo para a síntese de enzimas específicas necessárias à biodegradação; e (3) condições ambientais adequadas à realização dos processos metabólicos envolvidos no processamento do contaminante (GRADY, 1985; SEABRA, 2008).

Uma comunidade microbiológica que não tem condições ambientais específicas atendidas não será eficaz na biodegradação e entrará em fase de latência até que suas exigências metabólicas sejam disponibilizadas (SEABRA, 2008). Os principais limitantes da biodegradação natural de poluentes são a alta concentração do contaminante, falta de oxigênio, pH e temperatura inadequados, e baixa disponibilidade de água e nutrientes (MARIANO, 2006). Diversos fatores podem afetar a taxa de biodegradação de BTX (ICSS, 2006), os quais serão apresentados em maior detalhe adiante.

Tabela 2 – Revisão da literatura sobre as principais espécies de bactérias encontradas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados  
(continua)

<b>Espécie</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Local</b>	<b>Fonte</b>
Bactérias de biofilme	Biofilme	Benzeno	Dinamarca	ARVIN et al., 1989
<i>Pseudomonas putida</i>	*	BTX ( <i>p</i> -X)	Coréia do Sul	LEE et al., 1994
<i>Pseudomonas</i> PPO1	Resíduo industrial	BTX ( <i>p</i> -X)	Estados Unidos	OH et al., 1994
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Achromobacter anthropi</i>	Solo	TPH	França	RICHARD & VOGEL, 1999
<i>Acinetobacter lwoffii</i> , <i>A. haemolyticus</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Solo	Óleo diesel	Espanha	GALLEGO et al., 2001
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> T3-c	Biofiltro	BTEX	Coréia do Sul	LEE et al., 2002
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Acinetobacter junii</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Solo	TPH	Estados Unidos	BENTO et al., 2003
<i>Pseudomonas putida</i>	*	Benzeno Tolueno Fenol	Turquia	ABUHAMED et al., 2004
<i>Pseudomonas putida</i> CCM1 852	*	BTX	Brasil (São Paulo)	OTENIO et al., 2005
<i>Bacillus cereus</i> , <i>Ochrobactrum anthropic</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Solo	BTX HPA TPH	Brasil (São Paulo)	MARIANO, 2006
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Solo	BTX	Brasil (Porto Alegre)	TEIXEIRA, 2007
<i>Pseudomonas</i> spp.	Solo	BTX ( <i>o</i> -X)	Canadá	LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008

Tabela 2 – Revisão da literatura sobre as principais espécies de bactérias encontradas em estudos de biodegradação de petróleo e derivados (conclusão)

<b>Espécie</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Local</b>	<b>Fonte</b>
Microrganismos de solo contaminado, microrganismos de solo não contaminado, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Solo	Óleo diesel Biodiesel	Brasil (São Paulo)	MARIANO et al., 2008
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>	Solo e água	BTX e etanol	Brasil (Porto Alegre)	MORALES, 2008
Microrganismos heterotróficos totais	Solo	Tolueno	Brasil (Rio Grande)	CERQUEIRA & COSTA, 2009
<i>Hydrogenophaga spp.</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i>	Aquífero	Benzeno Tolueno	Estados Unidos	ABURTO & PEIMBERT, 2011
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. cibi</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lama contaminada com óleo e solo	Lama oleosa	Brasil (Rio Grande do Sul)	CERQUEIRA et al., 2011
<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Solo	TPH	Malásia	ABIOYE et al., 2012
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i>	Solo	Benzeno Óleo diesel	Índia	PRAKASH et al., 2014
<i>Bacillus sp.</i>	Água	Petróleo	Índia	UDGIRE et al., 2015
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. cereus</i>	Solo	Petróleo	Índia	PATOWARY et al., 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	*	Óleo diesel Biodiesel	África do Sul	FOSSO-KANKEU et al., 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	Sedimento de riacho	PHs	Nigéria	OYETIBO et al., 2017
<i>Bacillus spp.</i>	Aquífero	Óleo diesel	Brasil (Mato Grosso)	LIMA et al., 2018

\* Proveniente de coleção ou de origem não identificada; TPH = total petroleum hydrocarbons; PH = petroleum hydrocarbons. HPA = polycyclic aromatic hydrocarbons.  
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 3.5.1 Fatores físico-químicos

#### 3.5.1.1 Disponibilidade de doadores e aceptores de elétrons

Os hidrocarbonetos encontram-se em estado reduzido, e muitos microrganismos são capazes de oxidá-los durante o processo respiratório. A cinética de oxidação é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais elevados, com destaque para o oxigênio (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). Geralmente, o oxigênio atua comoceptor de elétrons para os compostos aromáticos, porém, em determinadas situações, o poluente aromático pode ser oceptor (CAO et al., 2009).

A biodegradação de BTX costuma ser aeróbia, mas também pode ocorrer em anaerobiose, embora de maneira muito mais lenta (LEAHY & COLWELL, 1990; ICSS, 2006; ATLAS & HAZEN, 2011). Neste caso, outros aceptores podem ser utilizados, tais como o nitrato, sulfato, manganês ou óxidos de ferro (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; BOOPATHY, 2000; ICSS, 2006). Também já foi relatada a degradação de benzeno e tolueno sob condições metanogênicas (LEAHY & COLWELL, 1990).

De todas as possíveis vias de biodegradação, a aeróbia é a mais rápida e eficiente (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; SANTOS, 1996; MARTINS, 2015). A mineralização de compostos aromáticos pela via aeróbia envolve a participação de enzimas mono e dioxigenases (LEAHY & COLWELL, 1990; BOOPATHY, 2000), sendo a ausência de oxigênio um de seus principais limitantes. Ao estudar a contaminação por óleo em corpos de água doce, Venosa et al. (2002) verificaram que a disponibilidade de oxigênio foi mais importante que a própria adição de nutrientes. Em ambientes terrestres, quanto mais poroso e aerado o solo, maior será a biodegradação (KAPLAN et al., 1997).

#### 3.5.1.2 Tipo e concentração do contaminante

Como já exposto anteriormente, quanto maior o tempo de contaminação em um dado ambiente, maior a probabilidade de este apresentar microrganismos biodegradadores (LEAHY & COLWELL, 1990; HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013). Isso porque existe uma pressão seletiva em favor das populações mais bem-sucedidas na metabolização dos contaminantes (TEIXEIRA, 2007; MELO & AZEVEDO, 2008; ABURTO & PEIMBERT, 2011; ADAMS et al., 2015).

A facilidade de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo diminui conforme aumenta sua complexidade molecular, de maneira que cadeias simples ou pouco ramificadas

são mais facilmente degradadas em comparação com compostos aromáticos. Na mesma perspectiva, quanto mais anéis aromáticos o composto possui, maior a dificuldade de sua degradação (VAN HAMME et al., 2003).

Outros fatores de grande relevância são a concentração do contaminante e sua associação com outras substâncias (ICSS, 2006; LITTLEJOHNS & DAUGULIS; 2008). A concentração deve conter uma dose mínima capaz de induzir a produção de enzimas específicas, mas não deve ser alta a ponto de tornar-se tóxica aos microrganismos (GRADY, 1985; ICSS, 2006). As concentrações toleráveis descritas na literatura são bastante variáveis, mas normalmente encontram-se entre 20 mg/L e 100 mg/L (OH et al., 1994; ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005; LITTLEJONHS & DAUGULIS, 2008).

Na presença de mais de um composto BTX, é possível que um interfira na biodegradação do outro (LEE et al., 2002; ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005; ABURTO & PEIMBERT, 2011). Littlejohns & Daugulis (2008) observaram que, quando misturados, tolueno e etilbenzeno não foram afetados reciprocamente, mas ambos inibiram a degradação do benzeno. No mesmo trabalho, os pesquisadores apontam que o *orto*-xileno sozinho não foi degradado, mas foi cometabolizado quando misturado com benzeno ou tolueno. Lee et al. (2002) encontraram um padrão parecido, onde os três isômeros de xileno só foram degradados na presença de tolueno. No estudo de Arvin et al. (1989), a presença de tolueno e xileno em misturas binárias estimulou a degradação de benzeno, porém, quando os três estavam juntos, a degradação de benzeno foi menor. É importante considerar que diferenças na cinética de degradação dos compostos monoaromáticos entre estudos distintos podem ser devidas à utilização de diferentes populações bacterianas (LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008).

A presença de outras substâncias em mistura com os BTX pode retardar sua degradação, principalmente quando se tratam de substratos mais facilmente metabolizados (MARIANO, 2006; TEIXEIRA, 2007). Ao estudar a degradação de misturas de benzeno, tolueno e fenol por *Pseudomonas putida* F1 (strain ATCC 700007), Abuhamed et al. (2004) verificaram que tolueno e benzeno aumentam a biodegradação de fenol, enquanto este inibe a biodegradação de ambos. Arvin et al. (1989) observaram que culturas com compostos contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio apresentaram menor degradação dos hidrocarbonetos aromáticos.

No Brasil, o exemplo típico da biodegradação preferencial em detrimento dos BTX é a adição de etanol à gasolina, fazendo com que estes compostos só sejam degradados após a completa metabolização do álcool (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; TEIXEIRA, 2007;

MORALES, 2008; MARTINS, 2015). Isso pode ser explicado devido à existência de microrganismos capazes de degradar álcoois simples ser mais comum na natureza, além de o etanol ser metabolizado por enzimas constitutivas, não havendo necessidade de adaptação prévia ao seu catabolismo (TEIXEIRA, 2007).

### 3.5.1.3 Nutrientes

Tratamentos de biorremediação normalmente requerem a adição de compostos nitrogenados, e eventualmente fosfatados (LEAHY & COLWELL, 1990; ICSS, 2006; ADAMS et al., 2015). A presença de nitrogênio e fósforo é crítica para que ocorra a biodegradação, uma vez que são nutrientes indispensáveis ao crescimento microbiano (MARIANO, 2006). Além disso, uma alta razão carbono–nitrogênio ou carbono–fósforo são desfavoráveis ao crescimento microbiano (LEAHY & COLWELL, 1990). Os micronutrientes necessários costumam estar disponíveis, não sendo necessária sua suplementação (ICSS, 2006).

A limitação de nutrientes, juntamente com a limitação de oxigênio, pode prolongar por muitos anos a biodegradação do poluente (mais de 20 anos, em alguns casos), havendo apenas mudanças pouco significativas em sua composição química. Isso é válido principalmente no centro do foco de contaminação, onde o poluente tem pouco contato com ambiente circundante (KAPLAN et al., 1997).

### 3.5.1.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

A influência do pH na biodegradação está relacionada à solubilidade de sais minerais e disponibilidade de nutrientes, assim como na atividade metabólica dos microrganismos (ARIAS et al., 2005). De maneira geral, microrganismos possuem melhor desempenho metabólico em pH neutro, apesar de fungos tolerarem condições mais ácidas (LEAHY & COLWELL, 1990). Embora o pH ideal possa ser considerado específico para cada espécie (SEABRA, 2008), tratando-se das bactérias, especificamente, o pH ideal para a biodegradação é entre 6 e 8 (LEE et al., 2002; ICSS, 2006).

### 3.5.1.5 Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais relevantes em relação à sobrevivência microbiana. Temperaturas baixas alteram a fluidez e permeabilidade da membrana celular,

enquanto temperaturas muito altas inativam proteínas e DNA por desnaturação (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). Quanto sua influência sobre os hidrocarbonetos, temperaturas baixas diminuem sua volatilidade e solubilidade em água, enquanto temperaturas elevadas geram aumento na volatilização dos compostos e solubilidade (SEABRA, 2008).

Embora hidrocarbonetos possam ser degradados em uma ampla faixa de temperatura (ZOBELL, 1946; LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS & HAZEN, 2011), e a temperatura ótima para o metabolismo seja específica para cada espécie (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996), variações ao redor dos 30 °C são consideradas ideais para bactérias (ICSS, 2006), sendo esta a opção de escolha da maioria dos autores que trabalham com biodegradação de BTX (OH et al., 1994; LEE et al., 2002; OTENIO et al., 2005; TEIXEIRA, 2007; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008; MORALES, 2008; PRAKASH et al., 2014).

#### 3.5.1.6 Disponibilidade de água

A água é necessária para o crescimento microbiano, difusão de nutrientes e eliminação de metabólitos (SEABRA, 2008). Sua presença é fundamental, pois é a partir da solubilização dos contaminantes que estes serão disponibilizados aos microrganismos (ICSS, 2006). Em solos, a água é um importante limitante da biodegradação, uma vez que sua disponibilidade é bastante variável (LEAHY & COLWELL, 1990).

Para que a degradação ocorra, os microrganismos devem estar em contato direto com os compostos a serem degradados (SEABRA, 2008). Contaminantes pouco solúveis ou associados a partículas ou outras substâncias podem estar inacessíveis à ação microbiana (ICSS, 2006). Este não é o caso dos BTX, cuja solubilidade em água é relativamente alta em comparação com outros hidrocarbonetos do petróleo (LEE et al., 2002).

### 3.5.2 Fatores biológicos

#### 3.5.2.1 Culturas puras *versus* mistas

Como os componentes do petróleo e seus derivados são diversos e complexos, é de se esperar que uma única espécie não seja capaz, sozinha, de degradar toda sua diversidade de contaminantes. Neste sentido, o uso de consórcios bacterianos com linhagens que possuem habilidades distintas tem se mostrado uma alternativa promissora à biodegradação (CAO et al., 2009; ADAMS et al., 2015). Isso talvez explique porque a capacidade de resiliência do solo costuma estar associada diretamente com a diversidade de microrganismos presente, de

maneira que solos com maior diversidade podem ser considerados mais resilientes (VAN HAMME et al., 2003).

A utilização de consórcios bacterianos, ao invés de culturas puras, aumenta as chances de biodegradação de contaminantes porque a metabolização de muitos deles ocorre em cometabolismo (GRADY, 1985; WETLER-TONINI et al., 2011). Assim, compostos intermediários gerados a partir da degradação parcial de um dado composto podem ser utilizados como substrato por outras linhagens (SANTOS, 1996). Além disso, não existe uma única via capaz de degradar os BTX completamente. Para a completa mineralização destes compostos, faz-se necessário o uso de uma comunidade microbiológica mista, com amplo espectro de degradação dos diferentes substratos (CAO et al., 2009).

Nos estudos de Prakash et al. (2014), o uso de um consórcio bacteriano se mostrou mais eficiente na degradação de óleo diesel em comparação com o uso de linhagens isoladas. Mariano (2006) também obteve melhores resultados de biodegradação utilizando consórcios, sugerindo que o uso de várias espécies pode ser mais interessante para uma degradação completa do poluente, especialmente em misturas complexas. Oh et al. (1994) adicionaram a amostras de lodo contaminado um consórcio microbiano com diversas linhagens e observaram que o *para*-xileno foi degradado somente em cultura mista. De acordo com a literatura, o número de linhagens utilizadas nos consórcios é variável, e na maioria dos casos consiste de espécies isoladas da própria área contaminada (MELO & AZEVEDO, 2008; CAO et al., 2009).

### 3.5.2.2 Metabolismo bacteriano

Uma vez na presença do contaminante, a população microbiana encontra-se na fase *lag* da curva de crescimento, na qual adapta-se às novas condições do meio. Nesta fase não há degradação, mas sim a produção das enzimas necessárias à metabolização do contaminante (ICSS, 2006). Em geral, a biodegradação de poluentes envolve a transcrição de regiões específicas do genoma bacteriano que levam à síntese de enzimas específicas necessárias à sua metabolização (MARIANO, 2006), tais como enzimas catabólicas e proteínas de captação do contaminante (CAO et al., 2009).

A seleção natural de microrganismos mais propensos à biodegradação está relacionada ao desenvolvimento de mecanismos de adaptação, geralmente caracterizados pela indução e/ou repressão de enzimas características e/ou mudanças genéticas (LEAHY & COLWELL, 1990; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). Embora os genes de biodegradação também possam estar presentes nos cromossomos, sua presença em elementos móveis

apresenta a vantagem de possibilitar sua rápida proliferação na população por meio de transferência horizontal, permitindo assim a rápida adaptação microbiana ao contaminante (CAO et al., 2009).

Diversos estudos demonstram que a transferência horizontal de genes tem importante função no desenvolvimento das vias metabólicas para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, em especial aqueles relacionados à degradação de compostos aromáticos (VAN HAMME et al., 2003). Genes relacionados à degradação de BTX normalmente estão localizados em plasmídeos, e suas vias de biodegradação mais conhecidas e bem estudadas são codificadas pelos plasmídeos TOL e TOD (WORSEY & WILLIAMS, 1975; GRADY, 1985; ZYLSTRA et al., 1988; LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS, 1995; CAO et al., 2009).

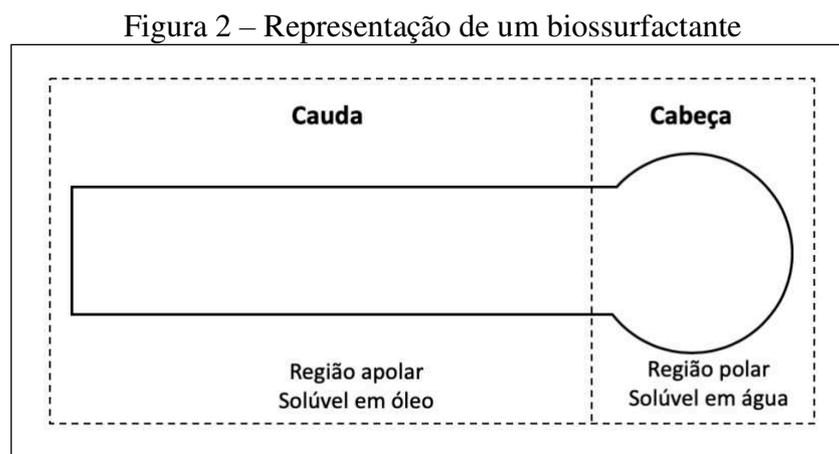
No metabolismo aeróbico, o principal responsável pela decomposição de HC aromáticos (CAO et al., 2009), as vias fundamentais de degradação envolvem reações de oxigenação promovidas por monooxigenases e/ou hidroxilação promovidas por dioxigenases. Estas reações resultam na formação de compostos dihidroxi, principalmente catecóis, que atuam como substratos intermediários de enzimas dependentes de oxigênio responsáveis pela clivagem do anel aromático (ATLAS, 1995; DÍAZ, 2004; HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013). Esta quebra pode ser via *orto*-clivagem, quando promovida por dioxigenases intradióis que rompem as ligações C–C entre os dois grupos hidroxila, ou *beta*-clivagem, quando realizada por dioxigenases extradióis que rompem as ligações C–C em uma região proximal a um dos dois grupos hidroxila (DÍAZ, 2004; CAO et al., 2009). Após a quebra do anel e formação de catecóis, estes são então degradados a intermediários do ciclo de Krebs (ATLAS, 1995; CAO et al., 2009).

Em bactérias, as vias metabólicas envolvidas na quebra do anel benzênico costumam ser semelhantes, enquanto aquelas responsáveis pelo reconhecimento e conversão de diferentes compostos aromáticos em metabólitos intermediários apresentam maior diversidade (CAO et al., 2009). Adicionalmente, compostos que possuem entre um e quatro anéis aromáticos podem ser completamente mineralizados por dioxigenases, gerando como produto final biomassa e dióxido de carbono. A via da monooxigenase também pode ocorrer, mas tem sido mais demonstrada em fungos e leveduras (HASSANSHAHIAN & CAPPELLO, 2013).

### 3.5.2.3 Produção de biossurfactantes

Alguns microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes, moléculas anfipáticas de origem biológica constituídas de uma porção hidrofílica e outra lipofílica (ICSS,

2006; MARIANO, 2006; TEIXEIRA, 2007; BENTO et al., 2008; DALTIM, 2011) (Figura 2). Biossurfactantes atuam como detergentes, possibilitando a solubilização de compostos oleosos (TEIXEIRA, 2007; BENTO et al., 2008). Dentre suas possíveis aplicações, há destaque para a biorremediação de petróleo e derivados, uma vez que contribuem para aumentar a disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos ao processo de degradação (ICSS, 2006; BENTO et al., 2008).



Fonte: adaptado de Daltin (2011).

Biossurfactantes podem pertencer à diferentes grupos químicos, tais como glicolipídeos, fosfolipídeos, lipoproteínas, lipopeptídeos e lipopolissacarídeos (BENTO et al., 2008; WALTER et al., 2010; ROY, 2017). Genericamente, costumam ser divididos em duas categorias: os de baixo peso molecular, capazes de diminuir a tensão superficial em soluções aquosas, e os de alto peso molecular, ou bioemulsificantes, capazes de formar emulsões (BENTO et al., 2008). A partir daqui o termo biossurfactante será empregado para se referir à ambas as categorias.

A tensão superficial consiste na força de atração eletroquímica existente entre as moléculas de um líquido, sendo que quanto maiores as forças intermoleculares, maior a tensão superficial (DALTIM, 2011). A capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial de uma solução tem relação com sua composição química, o que lhes permite se dispor preferivelmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (MARIANO, 2006; BENTO et al., 2008). A formação de emulsões, por sua vez, não está necessariamente atrelada à redução da tensão superficial, mas sim à “dispersão coloidal de gotículas de um líquido em outro” (BENTO et al., 2008, p. 155; YALÇIN et al., 2018).

A produção de biossurfactantes por microrganismos lhes permite crescer em substratos imiscíveis em água, uma vez que sua atividade contribui para aumentar a

disponibilidade do substrato no meio (TEIXEIRA, 2007; BENTO et al., 2008). Em comparação com surfactantes de origem sintética, os biossurfactantes apresentam como vantagem o fato de ser biodegradáveis e não tóxicos (BENTO et al., 2008), além de considerados mais eficientes por funcionar em maiores amplitudes de pH, temperatura e salinidade (MARIANO, 2006; BENTO et al., 2008; ROY, 2017; YALÇIN et al., 2018).

Áreas contaminadas com hidrocarbonetos são locais propícios para a identificação de espécies produtoras de biossurfactantes (WALTER et al., 2010; ROY, 2017). A investigação de sua produção costuma ser feita a partir do crescimento microbiano em meio de cultura mínimo contendo um substrato insolúvel (HEALY et al., 1996; BENTO et al., 2008), seguido por testes de triagem baseados nos efeitos físicos resultantes de sua atividade (WALTER et al., 2010; ROY, 2017). Num primeiro momento, métodos qualitativos são suficientes para a triagem de isolados produtores de biossurfactantes (WALTER et al., 2010). Dentre os testes mais utilizados destacam-se o teste de deslocamento de óleo e cálculo do índice de emulsificação.

O teste de deslocamento de óleo tem por objetivo identificar se uma dada amostra possui biossurfactantes pela observação de sua capacidade em “deslocar” um substrato oleoso inserido sobre uma lâmina de água (MORIKAWA et al., 2000; WALTER et al., 2010; ELDIN et al., 2019). Isso ocorre porque se houver biossurfactantes na amostra, estes irão promover a separação entre a fase aquosa da solução e a fase lipídica do óleo. Quanto maior a atividade tensoativa de um biossurfactante, maior será a área de deslocamento de óleo observada (GARCÍA-REYES & YANEZ-OCAMPO, 2016).

A produção de emulsão, por sua vez, geralmente é avaliada pelo teste de Índice de Emulsificação, também conhecido como IE24. Criado por Cooper & Goldenberg (1987), este teste explora a capacidade de alguns biossurfactantes de gerar emulsão, ou seja, uma mistura estável de substâncias com polaridades diferentes (BENTO et al., 2008). Sua execução consiste na adição, em tubos de ensaio de fundo reto, de iguais proporções de uma substância hidrofóbica e da amostra aquosa objeto de estudo. Ambas as substâncias são misturadas em vórtex por dois minutos na velocidade máxima e, em seguida, deixados em repouso por 24 horas. Após este período, se houver biossurfactantes com capacidade emulsificante será possível observar uma camada emulsificada entre as fases aquosa e oleosa, que corresponde à porção da mistura que se manteve estável (BENTO et al., 2008; WALTER et al., 2010; YALÇIN et al., 2018).

Como já mencionado, alguns biossurfactantes também são capazes de alterar a tensão superficial do meio de cultura (WALTER et al., 2010). A tensão superficial pode ser mensurada

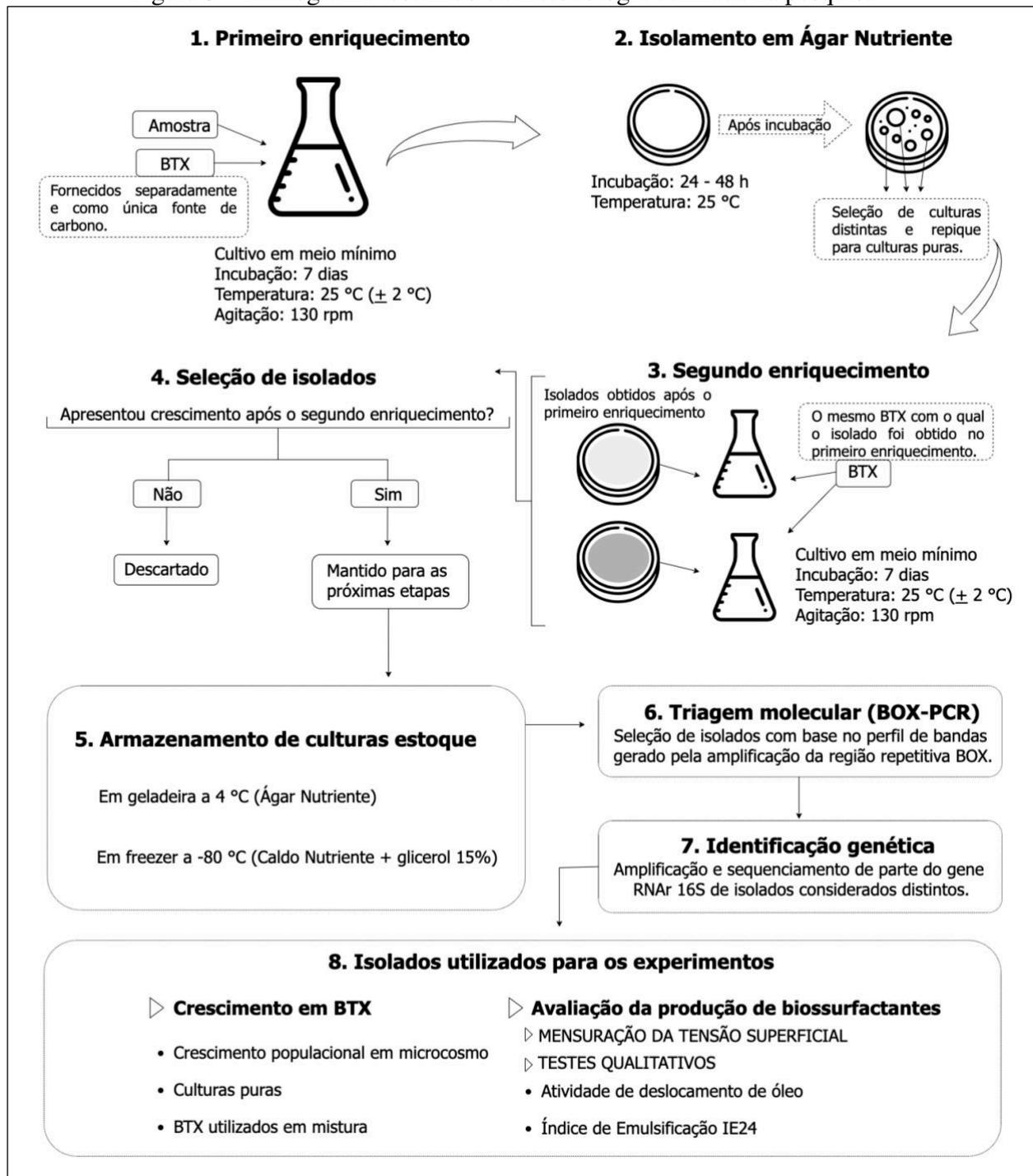
antes e após o cultivo microbiano, e sua redução é um indicador da presença de biossurfactantes de baixo peso molecular (BENTO et al., 2008). Normalmente são considerados bons produtores de biossurfactantes os microrganismos que reduzem a tensão superficial para valores abaixo de  $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (HABA et al., 2000; MORALES, 2008), mas critérios mais exigentes podem determinar que a redução seja inferior a  $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (PATOWARY et al., 2016).

Durante a realização de testes preliminares, é importante empregar métodos que considerem tanto a capacidade de emulsificação quanto a tensão superficial, uma vez que a atividade dos biossurfactantes sobre ambas nem sempre estão correlacionadas (BENTO et al., 2008; WALTER et al., 2010). Além disso, embora úteis na indicação da presença de biossurfactantes, deve-se considerar que testes qualitativos são genéricos e não diferenciam o tipo de surfactante produzido (BENTO et al., 2008).

## 4 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os passos utilizados desde a seleção dos isolados a partir das amostras estudadas, até os experimentos realizados na presença de BTX e avaliação da produção de biossurfactantes. A Figura 3 apresenta um fluxograma resumido das etapas executadas, as quais são descritas mais detalhadamente adiante.

Figura 3 – Fluxograma resumido da metodologia utilizada na pesquisa



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

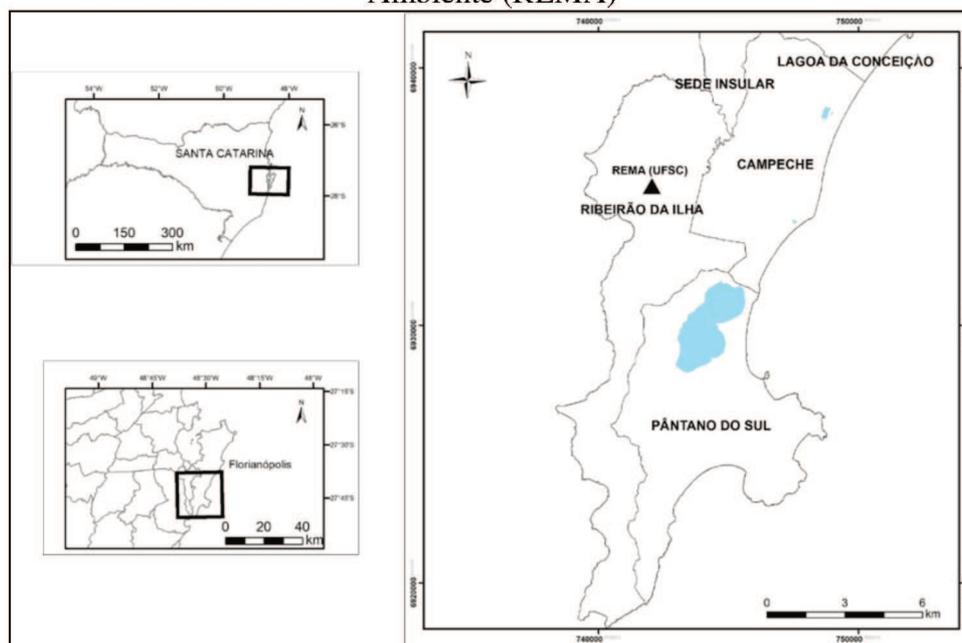
## 4.1 Isolamento de linhagens em meio de cultura enriquecido com BTX

### 4.1.1 Amostras

As amostras utilizadas no estudo são oriundas do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA), localizado na Fazenda Experimental da Ressacada (Figura 4), onde procedimentos de contaminação controlada vêm sendo realizadas desde 1998 por meio de projetos de pesquisa vinculados à PETROBRAS em associação com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Para a prospecção de microrganismos do presente estudo foram utilizadas duas amostras de água coletadas de um aquífero que foi contaminado em 2008 por meio da adição de 100 litros de uma mistura de óleo diesel (80% óleo petroquímico) e biodiesel de soja (20% biodiesel de soja). Uma das amostras corresponde a coleta efetuada a 2 metros e outra a 3 metros de profundidade, ambas coletadas por um aluno de doutorado do laboratório em 2017, e foram armazenadas em vidros âmbar e mantidas no laboratório em temperatura ambiente.

Figura 4 – Mapa indicando a localização do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente (REMA)

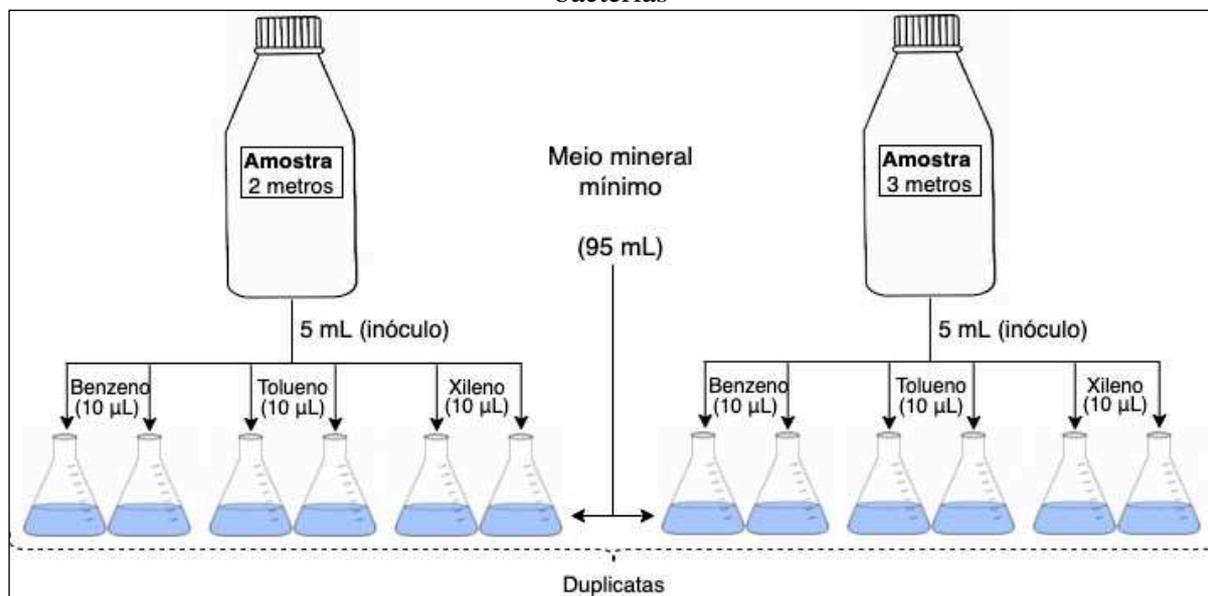


Base de dados: IBGE e Datum: SIRGAS 2000  
(Mapa elaborado por Thiago Fossile)

#### 4.1.2 Técnica de isolamento

As amostras estudadas foram enriquecidas com hidrocarbonetos BTX separadamente (reagentes P.A., Grupo Química Indústria Ltda; xileno composto por mistura proporcional dos três isômeros). Este cultivo se deu em duplicatas em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de volume final, e foi feito em Meio Mineral Mínimo (Anexo A) contendo os BTX como única fonte de carbono. Foram utilizados 5 mL de cada amostra como inóculo, e 10  $\mu$ L de benzeno (87.9 mg/L), tolueno (86.9 mg/L) ou xileno (86.7 mg/L) (Figura 5). O material permaneceu incubado por uma semana em temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sob agitação a 130 rpm (adaptado de TEIXEIRA, 2007).

Figura 5 – Esquema geral do experimento de enriquecimento utilizado para o isolamento de bactérias



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Após o período de incubação, 100  $\mu$ L de cada frasco foram inoculados em placas com ágar nutriente (em gramas por litro: extrato de carne, 1; extrato de levedura, 2; peptona, 5; cloreto de sódio, 5; ágar, 18; pH 7.2), as quais foram incubadas em estufa a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas. Em seguida, procedeu-se ao isolamento de colônias em ágar nutriente. A escolha das colônias se deu de acordo com diferenças visuais de morfologia, tamanho e coloração (adaptado de TEIXEIRA, 2007).

As linhagens isoladas permaneceram armazenadas em geladeira, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente 20 dias. Após este período, voltaram a ser cultivadas em meio mínimo na

presença do respectivo BTX da qual foram enriquecidas inicialmente, nas mesmas condições já descritas. Após o período de incubação, as culturas foram novamente inoculadas em ágar nutriente a fim de verificar quais apresentaram células viáveis. Os isolados que apresentaram crescimento foram então selecionados para dar continuidade à pesquisa, os quais foram mantidos em ágar nutriente a 4 °C e, adicionalmente, estocados em duplicatas em caldo nutriente (em gramas por litro: extrato de carne, 1; extrato de levedura, 2; peptona, 5; cloreto de sódio, 5; pH 7.2) contendo glicerol 15% em freezer -80 °C.

A nomenclatura dos isolados se deu de maneira a identificar (1) o contaminante com a qual foi inicialmente isolado, indicado pela letra “B” para o benzeno, “T” para o tolueno, e “X” para o xileno; (2) um número para diferenciar isolados da mesma amostra e fonte de enriquecimento, e (3) a indicação da amostra de origem, entre parêntesis, sendo “(2m)” para a amostra de 2 metros de profundidade e “(3m)” para a amostra de 3 metros de profundidade. Dois isolados provenientes do enriquecimento com xileno obtidos a partir da amostra de dois metros de profundidade, por exemplo, são identificados como “X1(2m)” e “X2(2m)”, respectivamente.

#### 4.1.3 Seleção e caracterização molecular dos isolados por BOX-PCR

Os isolados considerados distintos e que apresentaram células viáveis após o segundo enriquecimento com BTX foram submetidos a técnica molecular de BOX-PCR a fim de diferenciá-los geneticamente, e apenas aqueles considerados diferentes, segundo à técnica utilizada, foram selecionados para os testes posteriores.

Cada isolado foi coletado com uma alça de platina previamente esterilizada e inserido em tubos de plástico de 600 µL contendo 500 µL de tampão fosfato salino (PBS; em gramas por litro: NaCl, 8; KCl, 2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,42; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24). Os tubos fechados foram então submetidos ao choque térmico por meio da inserção em banho maria por 20 minutos a 85 °C, seguido de resfriamento em geladeira por 20 minutos a 4 °C. Este ciclo foi repetido quatro vezes.

A região repetitiva “BOX” está amplamente distribuída nos microrganismos, o que possibilita a rápida diferenciação de espécies de procariotos (VERSALOVIC et al., 1994), razão pela qual este método foi escolhido para distinguir os isolados. Cada reação de PCR foi preparada no volume final de 25 µL (cada uma contendo, em µL: 17,45 de água ultra pura; 2,5 de tampão para PCR; 1,9 de MgCl<sub>2</sub>; 1,25 de dMSO; 0,59 de primer BOX; 0,2 de cada dNTP; 0,1 de Taq Polimerase; e 1 do produto de extração de DNA). A amplificação da região

BOX foi realizada em Termociclador automático (*Mastercycler personal, Eppendorf*), sendo utilizados os seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 7 minutos a 94 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação); 1 minuto a 53 °C (anelamento); 8 minutos a 72 °C (extensão); e finalmente, 15 minutos a 72 °C (extensão final) (BENDIA et al., 2018).

O produto de PCR gerado na amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% preparado com solução tampão TAE 1X (Tris acetato-EDTA). A eletroforese teve duração de 3 horas e foi realizada com voltagem de 40 volts, sendo o gel registrado em fotodocumentador (*ChemiDoc MP, BioRad*).

O perfil de bandas de cada isolado foi analisado no software BioNumerics v.5.10 (*Applied Maths, Bélgica*). Padrões de bandas foram agrupados por similaridade e utilizados para construção de um dendrograma pelo método UPGMA e coeficiente de Dice (BENDIA et al., 2018). Isolados com padrões de bandas distintos foram selecionados para identificação via sequenciamento do gene RNAr 16S, sendo aqueles com valor de *bootstrap* superior a 75 considerados da mesma espécie.

## 4.2 Identificação das espécies

O produto de extração do DNA total foi submetido primeiro a purificação, e posteriormente a amplificação e sequenciamento de parte do gene RNAr 16S.

A purificação seguiu o seguinte protocolo: 100 µL de DNA extraído foram misturados à 200 µL de etanol (P.A.) gelado e 12 µL de NaCl 0.2M, e resfriados em freezer a -20 °C por 12 horas. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 70% (P.A.), seguido de centrifugação por 2 minutos a 13.000 rpm e descarte do sobrenadante. Após a completa secagem dos tubos em temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 100 µL de água ultrapura estéril, estando o material pronto para as próximas etapas (GREEN & SAMBROOK, 2016).

A fim de amplificar um fragmento do gene RNAr 16S, o DNA purificado foi submetido à reação de PCR utilizando os *primers* degenerados 27F (-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-) (LANE et al., 1991) e 1492R (-GGTTACCTTGTTACGACTT-) (TURNER et al., 1999). As reações foram realizadas segundo Turner et al. (1999), as quais foram preparadas no volume final de 25 µL (cada uma

contendo, em  $\mu\text{L}$ : 19,95 de água ultra pura; 2,5 de tampão para PCR; 0,75 de  $\text{MgCl}_2$  50 mM; 0,25 de cada primer, ambos na concentração de 20  $\mu\text{M}$ ; 0,2 de cada dNTP 100 mM; 0,1 de Taq Polimerase 5 U/ $\mu\text{L}$ ; e 1 do produto de DNA purificado). A amplificação foi realizada em Termociclador automático (*Mastercycler personal, Eppendorf*), sendo utilizados: 1 ciclo de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; e 35 ciclos de amplificação de 2 minutos, cada qual subdividido em: 15 segundos a 95 °C (desnaturação); 15 segundos a 49 °C (anelamento dos *primers*); e 90 segundos a 42 °C (elongamento) (DUARTE, 2010).

O sequenciamento dos amplicons foi realizado por empresa terceirizada (Macrogen, Coréia do Sul), e os dados resultantes analisados no software 4Peaks (*Nucleobytes BV, Amsterdam*). As sequências obtidas foram editadas a fim de remover nucleotídeos com *Phred score* inferior a 20, e os segmentos resultantes comparados no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta BLASTn (*nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*). Considerando os dados do sequenciamento, para a identificação do isolado X3(2m) optou-se por remover nucleotídeos com *Phred score* inferior a 15. Isolados que não puderam ser identificados por meio do sequenciamento foram caracterizados quanto a morfologia celular e coloração de Gram.

### **4.3 Avaliação do crescimento na presença de BTX**

#### **4.3.1 Preparo do inóculo**

Culturas estoque armazenadas em placas com ágar nutriente foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de volume contendo 20 mL de caldo nutriente. O material permaneceu incubado por aproximadamente 48 horas a 30 °C e 130 rpm. Após a incubação, mensurou-se a Densidade Óptica (D.O.) das culturas em espectrofotômetro a 600 nm, as quais foram ajustadas para valores de absorbância entre 0.7 e 0.8, exceto para as amostras X2(2m) e X3(2m), que apresentaram crescimento lento e foram utilizadas com D.O. de 0.2. Para o preparo dos inóculos, 1 mL da cultura crescida em caldo nutriente (ou o volume corrigido para a D.O. desejada) foi inserido em microtubo e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas 2 vezes com meio mínimo estéril. Finalmente, as células foram suspensas em 1 mL de meio mínimo, estando prontas para inoculação em meio de cultura contendo BTX. Os mesmos procedimentos foram realizados com as amostras X2(2m) e X3(2m), com a diferença

de que foram utilizados 2 mL de cultura, uma vez que a D.O. obtida encontrou-se abaixo dos limites previamente estipulados (adaptado de TEIXEIRA, 2007).

#### 4.3.2 Cultivo em BTX

O cultivo na presença de BTX foi realizado em frascos de vidro tipo penicilina de 100 mL contendo 20 mL de volume final (19 mL de meio mínimo e 1 mL de inóculo – exceto para X2(2m) e X3(2m), onde se utilizou 18 mL de meio mínimo e 2 mL de inóculo). Para a adição dos BTX, os três hidrocarbonetos foram misturados em igual proporção em um recipiente de vidro estéril e, em seguida, 9  $\mu$ L da mistura foram transferidos para os vidros de penicilina (concentração calculada: benzeno: 131.9 mg/L; tolueno: 130.4 mg/L; xileno: 130.0 mg/L). Imediatamente após a inserção dos BTX os frascos foram fechados com tampas de borracha e selados com septos de alumínio (Figura 6). O cultivo foi realizado em duplicatas e se deu em incubadora com agitação de 130 rpm e 30 °C ( $\pm$  2 °C) (adaptado de TEIXEIRA, 2007).

Figura 6 – Fotografia dos frascos de penicilina lacrados utilizados para o cultivo na presença de BTX



Em *a*: imagem de perfil do frasco; em *b*: detalhe do lacre em alumínio inserido sobre a tampa de borracha.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

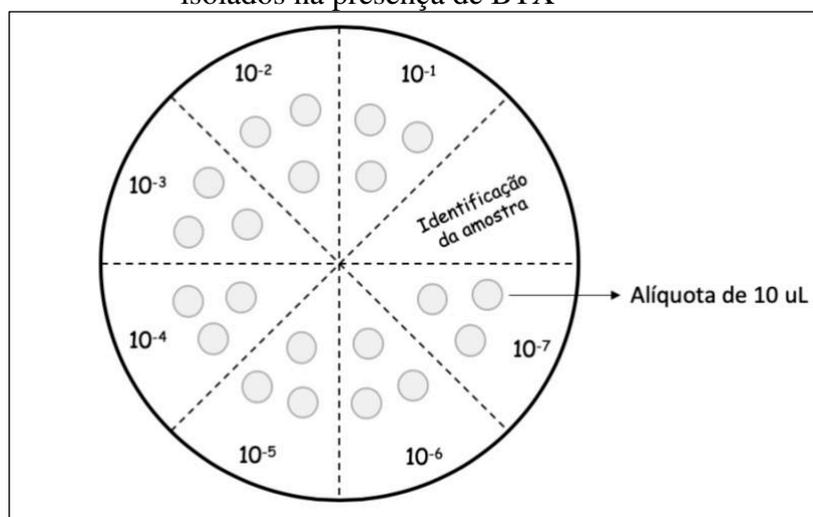
#### 4.3.3 Monitoramento do crescimento bacteriano

O monitoramento da população bacteriana se deu a cada 48 horas ao longo de 10 dias, iniciando-se no Tempo zero (T0), no momento antecedente à inoculação com BTX, até o Tempo cinco (T5). Um último tempo de monitoramento (T6) foi avaliado após 30 dias de incubação.

A estimativa da população bacteriana presente nos frascos foi realizada por meio da técnica de diluição seriada e contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs) pelo método da gota (MILES et al., 1983). Para a diluição seriada, seringas estéreis de 1 mL de volume

foram utilizadas para coletar e transferir 0,1 mL de cultura dos frascos para microtubos contendo 0,9 mL de solução salina 0,85%. Após misturados manualmente, 0,1 mL foram retirados e transferidos para outro microtubo com 0,9 mL de solução salina (0,85%), e assim sucessivamente, até a diluição correspondente à  $10^{-7}$ . Em seguida, a partir de cada diluição foram retiradas 3 alíquotas de 10  $\mu$ L, as quais foram depositadas em placas com ágar nutriente previamente divididas em 8 quadrantes (Figura 7). Após a completa absorção das gotículas pelo meio de cultura, as placas foram fechadas e incubadas a 25 °C por 24 a 48 horas. A contagem de UFCs foi realizada a partir de diluições que resultaram no maior número de colônias não coalescentes.

Figura 7 – Representação geral do método da gota utilizado para monitorar o crescimento dos isolados na presença de BTX



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os resultados obtidos, em UFC/mL, foram normalizados e inseridos em um gráfico utilizando o Microsoft Excel (Versão 16.37, 2019), no qual foram relacionados os dados sobre a variação populacional dos isolados ao longo dos 6 tempos de monitoramento.

A fim de melhor expressar o desempenho individual de cada isolado em resposta à mistura de BTX, criou-se também uma classificação indicativa da sobrevivência populacional dos isolados entre os tempos de monitoramento. Nesta classificação foram observados os eventos de acréscimo e decréscimo populacional, verificando-se assim se a população teve aumento ou diminuição no número de células viáveis em comparação com o tempo de análise imediatamente anterior. Para calcular o desempenho de cada isolado aplicou-se a fórmula a

seguir, a qual expressa a porcentagem do número de eventos de acréscimo celular ao longo do tempo.

$$\text{Desempenho} = \left( \frac{\text{Total de acréscimos}}{\text{Total de tempos}} \right) \times 100$$

Para a análise entre T5 e T6, calculou-se também a diferença média no número de UFC/mL entre os tempos, sendo os isolados então classificados de acordo com a magnitude da diferença observada no número de células. As categorias definidas são: 1, para diferença de até 100 mil células ( $<1 \times 10^5$ ); 2, para diferença entre 100 mil e 500 mil células ( $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ ); 3, para diferença entre 500 mil e 1 milhão de células ( $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ ); e 4, para diferenças superiores a 1 milhão de células ( $>1 \times 10^6$ ).

#### 4.4 Avaliação da produção de biossurfactantes

##### 4.4.1 Cultivo para estimular a produção de biossurfactantes

Os isolados foram cultivados em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de volume contendo 20 mL de meio mínimo suplementado com 1% de glicose (v/v) e 1% de óleo de soja (v/v). O cultivo foi realizado em duplicatas durante 7 dias a 30 °C e 130 rpm. Após o período de incubação, o volume total de cada cultura foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado por 15 minutos a 4500 rpm (adaptado de YALÇIN et al., 2018). O sobrenadante então foi utilizado para a realização dos testes descritos a seguir.

Considerando os resultados de tensão superficial encontrados, o isolado B1(3m) foi também cultivado nas condições descritas acima em meio suplementado com 1% de caldo nutriente (v/v) e 1% de óleo de soja (v/v), a fim de verificar como o uso de um meio de cultura mais nutritivo iria influenciar a variação da tensão superficial do meio.

##### 4.4.2 Testes utilizados

###### 4.4.2.1 Atividade de deslocamento de óleo

Para a realização deste teste foram utilizadas placas de Petri de 5 cm de diâmetro, sobre as quais foram adicionados 5 mL de água destilada e, sob a camada de água, 2 mL de

óleo queimado de motor. Em seguida, cuidadosamente foram adicionados 250  $\mu$ L das amostras no centro da placa. Após 2 minutos, mediu-se a área clara formada, quando observada (adaptado de YALÇIN et al., 2018). SDS 2% e meio mineral suplementado com 1% de glicose e 1% de óleo de soja foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.4.2.2 Índice de Emulsificação IE24

Para testar a capacidade emulsificante dos isolados, 2 mL da cultura livre de células foram inseridos em tubos de vidro com fundo reto e misturados com 2 mL óleo de soja por 2 minutos em agitador automático na velocidade máxima. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 24 horas em temperatura ambiente, e o Índice de Emulsificação (IE24) foi calculado por meio da divisão entre a altura da camada emulsificada e a altura total da coluna, multiplicado por 100 (COOPER & GOLDENBERG, 1987). SDS 2% e meio mineral suplementado com 1% de glicose e 1% de óleo de soja foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.4.2.3 Mensuração da tensão superficial

As medidas de tensão superficial em  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . (mili Newton por metro) foram realizadas utilizando um goniômetro da marca Ramé-Hart Instrument Co. (Modelo 250-F1) e analisadas pelo Software DROPimage Advanced (*Ramé-Hart Instrument Co.*) utilizando o método da gota pendente. Para a determinação da tensão superficial utilizou-se aproximadamente 3 mL de amostra. Todas as medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 °C – 28 °C), sendo que a cada leitura o equipamento mensurou a tensão superficial dez vezes (o resultado é dado como a média obtida entre as dez medidas). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada, e a seringa utilizada foi lavada entre a coleta de amostras distintas, três vezes com água destilada, e duas vezes com a própria amostra a ser analisada, respectivamente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Isolados selecionados

#### 5.1.1 Isolados obtidos a partir do enriquecimento com BTX

Com base em características morfológicas das colônias, após o primeiro enriquecimento das amostras com os contaminantes BTX foram obtidas 18 linhagens bacterianas distintas. Destas, após o segundo enriquecimento com o respectivo BTX a partir do qual as mesmas foram obtidas, restaram 12 linhagens, sendo 9 oriundas da amostra referente à 2 metros de profundidade, e 3 oriundas da amostra referente à 3 metros de profundidade. Quanto ao total de isolados obtidos a partir dos diferentes contaminantes, 5 são resultado do enriquecimento com benzeno, 2 do enriquecimento com tolueno, e 5 do enriquecimento com xileno (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de isolados obtidos a partir do enriquecimento com BTX considerando o contaminante utilizado no enriquecimento e a amostra de origem

Contaminante	3 metros de profundidade	2 metros de profundidade	Total
Benzeno	3	2	5
Tolueno	0	2	2
Xileno	0	5	5
Total	3	9	12

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 5.1.2 Triagem genética dos isolados (BOX-PCR)

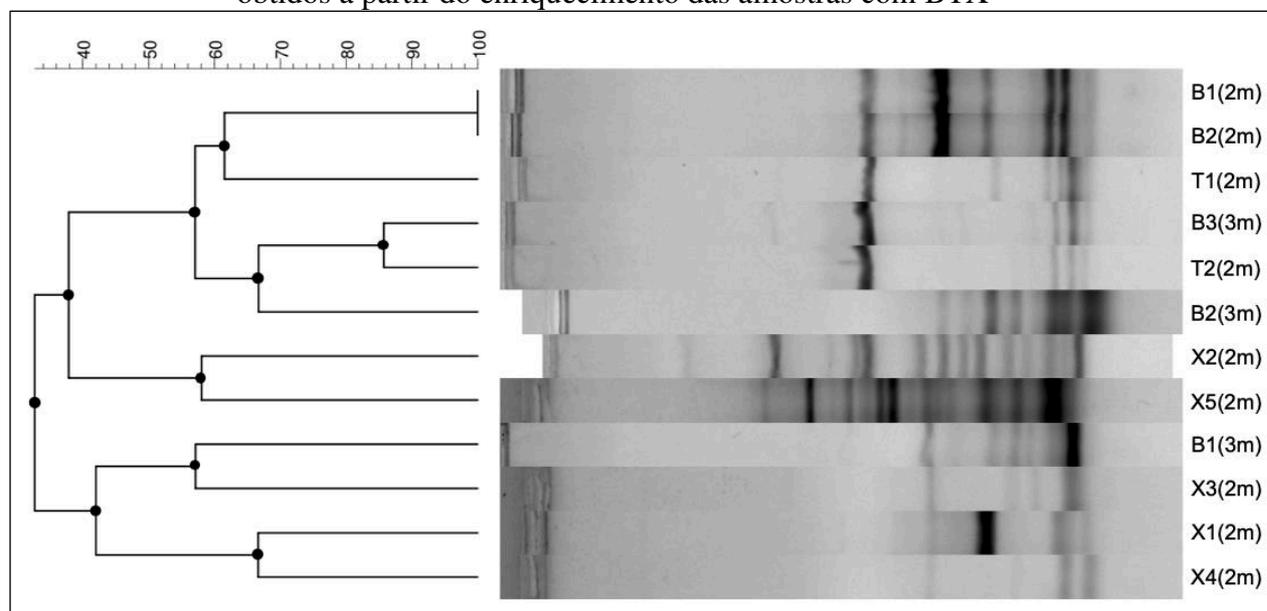
De acordo com a análise molecular dos isolados por meio da BOX-PCR, a partir dos 12 isolados obtidos restaram 10 considerados geneticamente distintos. O perfil de bandas gerado a partir das eletroforeses indicou que pertencem à mesma espécie as linhagens B1(2m) e B2(2m) (*bootstrap* = 100) e B3(3m) e T2(2m) (*bootstrap* = 88), respectivamente (Figura 8).

### 5.2 Identificação das espécies

A partir do sequenciamento de parte do gene RNA 16S foi possível realizar a identificação genética de oito, dos dez isolados (Tabela 4). Os isolados B1(3m) e B3(3m) não

puderam ser identificados devido a valores de *Phred score* muito baixos. Por meio de avaliação microscópica e coloração de Gram, ambos são caracterizados como cocos Gram negativos.

Figura 8 – Dendrograma e perfil de bandas das eletroforeses referente aos doze isolados obtidos a partir do enriquecimento das amostras com BTX



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 4 – Identificação genética dos isolados por meio de sequenciamento de fragmento do gene RNAr 16S

Isolado	Tam. Frag.	Identificação (nº de acesso)	Q. C. (%)	E value	% Id.	Fonte do isolamento	Referência
B2(3m)	1024	<i>Staphylococcus xylosus</i> (KX507086)	100	0,0	99,32	Ar de sala escura para fermentação de chá	Yuan, 2016
B1(2m)	1090	<i>Leifsonia</i> sp. (KT462730)	99	0.0	97.61	Solo	Joshi et al., 2015
T1(2m)	1088	<i>Bacillus</i> sp. (MN559531)	100	0.0	99.54	Lago Dianchi	Yang & Hou, 2019
X1(2m)	1036	<i>Bacillus</i> sp. (KU644243)	100	0.0	98.36	Amostra de saída de usina de biogás	Glaeser et al., 2016
X2(2m)	182	<i>Staphylococcus warneri</i> (MG788294)	100	1,00E-80	100	Área de disposição de resíduo de níquel	Não publicado
X3(2m)	183	<i>Bacillus</i> sp. (JX975450)	100	2,00E-82	97,8	Lama anaeróbia	Wang et al., 2012
X4(2m)	443	<i>Bacillus safensis</i> (MN428231)	100	0,0	99,77	Solo	Tantirungkij, 2019
X5(2m)	1105	<i>Brevibacillus reuszeri</i> (MF322890)	100	0.0	99.19	Não identificado	Liu, 2017

\* Tam. Frag. = Tamanho do fragmento em pares de bases; Q. C. (%) = Query Cover; Id. = Porcentagem de identidade.

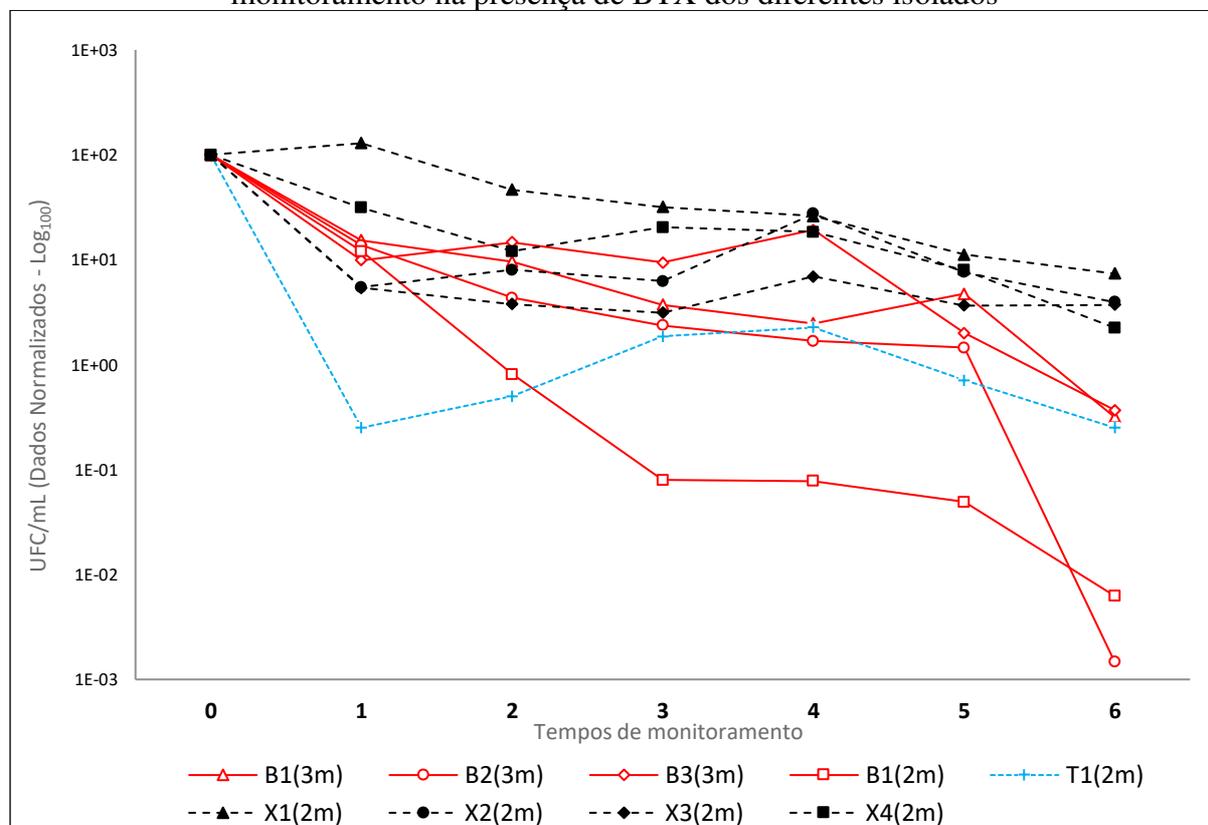
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 5.3 Avaliação do crescimento dos isolados na presença de BTX

Os resultados referentes ao crescimento em BTX foram normalizados e estão apresentados na Figura 9. Complementando estes resultados, a porcentagem de eventos de crescimento considerando todos os tempos analisados é apresentada na Figura 10. O isolado X5(2m) foi desconsiderado destas análises, uma vez que apresentou valores de UFC/mL sempre inferiores à  $2 \times 10^5$ , além de uma de suas duplicatas não apresentar nenhuma célula viável a partir de 2 dias de monitoramento.

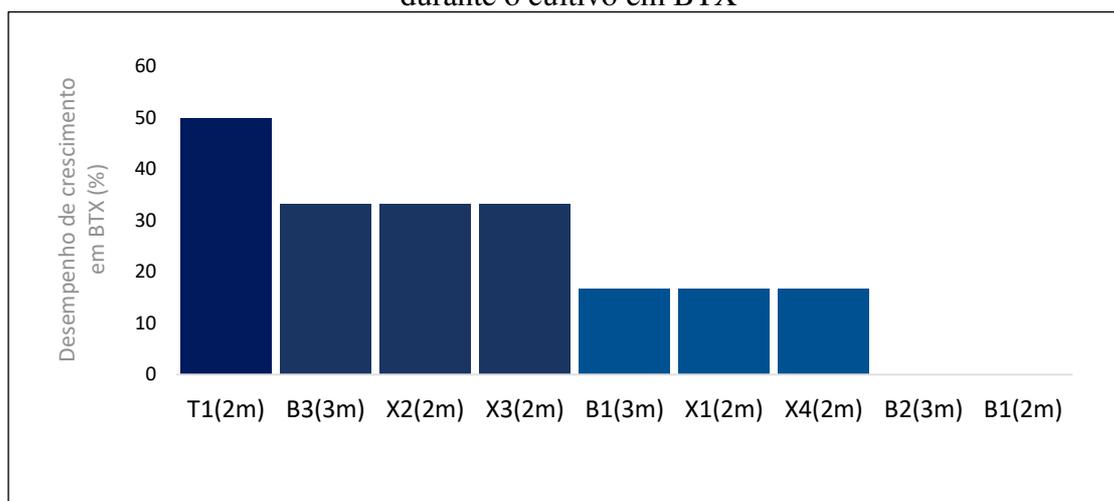
Analisando-se ambas as Figuras, observa-se que o isolado T1(2m) apresentou o melhor desempenho de crescimento ao longo dos tempos analisados (50%), com incrementos populacionais em 3 pontos (T2, T3 e T4). B3(3m), X2(2m) e X3(2m) apresentaram acréscimo populacional em 2 tempos de análise (33%), e B1(3m), X1(2m) e X4(2m) em somente 1 tempo de análise (17%). Já os isolados B2(3m) e B1(2m) apresentaram os piores desempenhos, havendo apenas decréscimo no número de células viáveis ao longo de todos os tempos de monitoramento.

Figura 9 – Gráfico mostrando a relação entre o número de UFC/mL e os tempos de monitoramento na presença de BTX dos diferentes isolados



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 10 – Gráfico mostrando a classificação dos isolados com relação ao desempenho durante o cultivo em BTX



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os resultados sobre a diferença no número de UFC/mL entre 10 dias (T5) e 30 dias (T6) de cultivo na presença de BTX estão apresentados na Tabela 5. O isolado que apresentou a menor diferença do número de células viáveis foi X3(2m), inclusive sendo o único a apresentar um incremento de células ( $5 \times 10^4$  UFC/mL). Todos os demais isolados apresentaram apenas decréscimo na população, sendo três classificados na categoria 2 (X1(2m), T1(2m) e X4(2m); variação entre  $1 \times 10^5$  UFC/mL e  $5 \times 10^5$  UFC/mL), um na categoria 3 (B1(2m); variação entre  $5 \times 10^5$  UFC/mL e  $1 \times 10^6$  UFC/mL), e quatro na categoria 4 (X2(2m), B2(3m), B3(3m), e B1(3m); variação superior a  $1 \times 10^6$  UFC/mL). O pior desempenho avaliado corresponde à B2(3m), no qual se observou uma redução no número de células viáveis da ordem 986 vezes entre 10 e 30 dias de cultivo em BTX.

Tabela 5 – Diferença no número de UFC/mL entre 10 dias (T5) e 30 dias (T6) de cultivo na presença de BTX e respectiva classificação dos isolados

Dias Tempo	10 T5	30 T6	Diferença (em UFC/mL)	Razão entre T5 e T6	Categoria
X3(2m)	$3,05 \times 10^6$	$3,10 \times 10^6$	$+ 5,00 \times 10^4$	1	1
X1(2m)	$4,95 \times 10^5$	$3,25 \times 10^5$	$- 1,70 \times 10^5$	2	2
T1(2m)	$4,40 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$	$- 2,85 \times 10^5$	3	2
X4(2m)	$5,85 \times 10^5$	$1,65 \times 10^5$	$- 4,20 \times 10^5$	4	2
B1(2m)	$9,85 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$- 8,60 \times 10^5$	8	3
X2(2m)	$5,90 \times 10^6$	$3,05 \times 10^6$	$- 2,85 \times 10^6$	2	4
B3(3m)	$4,25 \times 10^6$	$7,85 \times 10^5$	$- 3,47 \times 10^6$	5	4
B1(3m)	$6,50 \times 10^6$	$4,34 \times 10^5$	$- 6,07 \times 10^6$	15	4
B2(3m)	$3,45 \times 10^6$	$3,50 \times 10^3$	$- 3,45 \times 10^6$	986	4

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

## 5.4 Produção de biossurfactantes

A verificação da produção de biossurfactantes foi realizada por meio dos testes de deslocamento de óleo e IE24. Adicionalmente, optou-se também pela mensuração da tensão superficial do meio de cultura contendo óleo de soja. As três metodologias empregadas indicam, indiretamente, se um microrganismo tem potencial de produzir biossurfactantes, e são amplamente empregados em estudos de triagem nesta área. O teste de deslocamento de óleo e IE24 consistem de métodos qualitativos, sendo o último um bom indicador da produção de biossurfactantes de alto peso molecular. A medida da tensão superficial, por sua vez, trata-se de uma aferição, e sua diminuição em uma dada cultura está associada a produção de biossurfactantes de baixo peso molecular.

### 5.4.1 Atividade de deslocamento de óleo

Neste teste, que é baseado na adição de uma alíquota da amostra sobre uma camada de óleo (a qual flutua sobre uma camada de água), espera-se que havendo biossurfactantes na amostra esta promova a formação de uma área clara sobre o óleo. O tamanho da área pode ser então mensurado e comparado com o controle, indicando assim seu potencial de ação surfactante.

Dos 10 isolados avaliados, quatro apresentaram alguma atividade de deslocamento de óleo, todos formando uma área de deslocamento inferior a 5 mm, bem inferior ao controle (15 mm). Estes isolados foram: B1(2m) (*Leifsonia* sp), T1(2m) (*Bacillus* sp), X5(2m) (*Brevibacillus reuszeri*) e X3(2m) (*Bacillus* sp), sendo apenas este último com resultado positivo em ambas as duplicatas (Figura 11).

Figura 11 – Registro fotográfico dos isolados com resultado positivo no teste de deslocamento de óleo



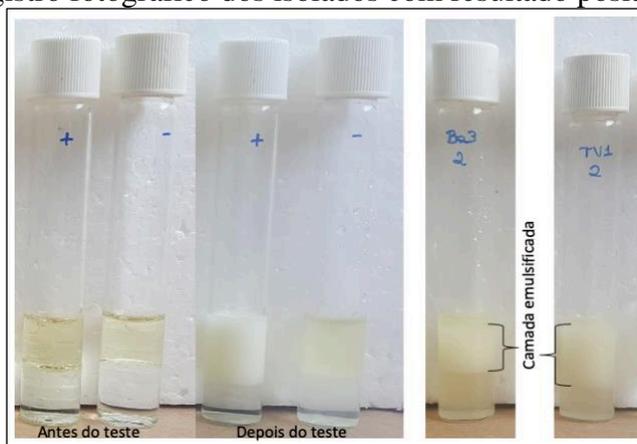
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 5.4.2 Índice de Emulsificação IE 24

Neste teste, iguais proporções da amostra de interesse e de um substrato hidrofóbico, geralmente um óleo, são misturadas vigorosamente por 2 minutos e em seguida deixados em repouso por 24 horas. Após este período, havendo produção de emulsão, ou seja, formação de mistura estável entre a amostra e o óleo, observa-se uma terceira fase de separação entre as fases aquosa e oleosa, a qual é então utilizada para calcular o índice de emulsificação.

Dos isolados testados quanto a produção de emulsão por meio deste método, apenas dois apresentaram resultado positivo, ambos com somente uma das duplicatas (Figura 12). Considerando somente os tubos positivos, o isolado B3(3m) (cocos Gram negativa) apresentou IE24 de 43%, e T1(2m) (*Bacillus* sp.) de 63%.

Figura 12 – Registro fotográfico dos isolados com resultado positivo no teste IE24



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 5.4.3 Mensuração da tensão superficial

Considerando a capacidade de alguns biossurfactantes em reduzir a tensão superficial, sua medida é frequentemente empregada em associação com outros testes na busca por microrganismos capazes de produzir tais compostos.

Os valores médios da tensão superficial obtidos a partir do cultivo dos isolados em meio mínimo com 1% de óleo de soja e 1% de glicose estão apresentados na Tabela 6. Os isolados B1(2m) (*Leifsonia* sp.), T1(2m) (*Bacillus* sp.), X2(2m) (*Staphylococcus warneri*), X3(2m) (*Bacillus* sp.) e X5(2m) (*Brevibacillus reuszeri*) aumentaram a tensão superficial do meio de cultura, enquanto os demais a diminuíram. Dentre o último grupo, tem destaque o isolado B1(3m) (cocos Gram negativa), o qual apresentou a maior redução observada (48,23

mN•m<sup>-1</sup>). Este isolado também foi cultivado, posteriormente, nas mesmas condições já descritas, mas em meio suplementado com 1% de caldo nutriente, ao invés de 1% de glicose. Nestas condições, se observou maior redução na tensão superficial, a qual foi registrada em 34,70 mN•m<sup>-1</sup> (Tabela 7).

Tabela 6 – Valores médios de tensão superficial (mN•m<sup>-1</sup>) obtidos a partir do cultivo em meio mínimo com 1% de óleo de soja e 1% de glicose

Branco	B1(3m)	B2(3m)	B3(3m)	B1(2m)	T1(2m)	X1(2m)	X2(2m)	X3(2m)	X4(2m)	X5(2m)
61	48,23	53,44	52,18	61,81	61,69	58,57	62,00	61,24	54,58	63,23

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 7 – Valor médio de tensão superficial (mN•m<sup>-1</sup>) obtido a partir do cultivo do isolado B1(3m) em meio mínimo com 1% de óleo de soja e 1% de caldo nutriente

Branco	B1(3m)
55	34,70

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

## 5.5 Síntese dos resultados

A Tabela 8 apresenta a identificação dos isolados e uma síntese dos resultados obtidos a partir dos diferentes experimentos realizados. Segue adiante também uma descrição de todos os resultados para cada um dos dez isolados investigados.

Tabela 8 – Síntese dos resultados obtidos considerando todos os experimentos realizados

Identificação		Testes biossurfactantes			Crescimento em BTX	
Isolado	Espécie	Desl. Óleo	IE24	TS	Desempenho T1 – T6	Classificação T5 – T6
<b>B1(3m)</b>	Não identificada	–	–	+	17%	4
<b>B2(3m)</b>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	–	–	–	0%	4
<b>B3(3m)</b>	Não identificada	–	+	–	33%	4
<b>B1(2m)</b>	<i>Leifsonia</i> sp.	+	–	–	0%	3
<b>T1(2m)</b>	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	–	50%	2
<b>X1(2m)</b>	<i>Bacillus</i> sp.	–	–	–	17%	2
<b>X2(2m)</b>	<i>Staphylococcus warneri</i>	–	–	–	33%	4
<b>X3(2m)</b>	<i>Bacillus</i> sp.	+++	–	–	33%	1
<b>X4(2m)</b>	<i>Bacillus safensis</i>	–	–	–	17%	2
<b>X5(2m)</b>	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	+	–	–	NA	NA

Desl. Óleo = Deslocamento de Óleo; IE24 = Índice de Emulsificação IE24; TS = Tensão superficial (positivo quando diminuiu a TS do meio abaixo de 35 mN•m<sup>-1</sup>, segundo PATOWARY et al., 2016); + = uma duplicata com resultado positivo; +++ = duas duplicatas com resultado positivo; NA = Não se aplica.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O isolado B1(3m) consiste de uma bactéria Gram negativa, de morfologia em forma de cocos, e não pode ser identificado por meio de sequenciamento genético. Durante o cultivo em BTX, B1(3m) sempre apresentou decréscimo da população, exceto entre 8 e 10 dias de cultivo (T4 e T5, respectivamente). Aos 30 dias de monitoramento, o número de UFC/mL diminuiu cerca de 15 vezes, deixando o isolado na categoria 4 na avaliação da variação entre T5 e T6. Quanto aos testes para a produção de biossurfactantes, este isolado apresentou resultado positivo somente na redução da tensão superficial, que diminuiu para  $48,23 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  quando cultivado em meio mínimo suplementado com 1% de óleo de soja e 1% de glicose, e para  $34,70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  quando cultivado em meio mínimo suplementado com 1% de óleo de soja e 1% de caldo nutriente.

O isolado B2(3m), identificado como *Staphylococcus xylosus*, apresentou o pior desempenho durante o cultivo em BTX. Além de apresentar apenas diminuição no número de UFC/mL durante todos os tempos monitorados, apresentou também a queda mais expressiva no número de células entre 10 (T5) e 30 (T6) dias de cultivo (categoria 4), com uma redução na quantidade de células da ordem de 986 vezes. Este isolado respondeu negativamente a todos os testes para a produção de biossurfactantes.

O isolado B3(3m) também não pode ser identificado por meio de sequenciamento genético. Assim como B1(3m), a análise microscópica mostrou que se trata de bactéria cocos Gram negativa. Considerando a sobrevivência em BTX, B3(3m) apresentou desempenho de 33%, o que significa que houveram pelo menos dois eventos de crescimento populacional durante o cultivo. Na avaliação entre T5 e T6, o isolado apresentou queda considerável no número de células viáveis, com diferença em UFC/mL superior a 1 milhão de células (categoria 4). Em relação a produção de biossurfactantes, uma de suas duplicatas apresentou a produção de 43% de emulsão durante o teste IE24.

O isolado B1(2m), identificado como *Leifsonia* sp., apresentou um dos piores desempenhos quanto a sobrevivência em BTX, sem nenhum evento de incremento celular durante o período monitorado. Considerando a sobrevivência entre T5 e T6, B1(2m) foi classificado na categoria 3, com diferença no número de células de  $8,60 \times 10^5$  UFC/mL. Nos testes para triagem de produtores de biossurfactantes, uma de suas duplicatas foi capaz de promover o deslocamento de óleo.

O isolado T1(2m) foi uma das quatro linhagens identificadas como *Bacillus* sp., sendo quem apresentou melhor desempenho no cultivo em BTX (50%). A partir de 4, 6 e 8 dias de monitoramento (T2, T3 e T4, respectivamente), sempre se observou aumento na quantidade de UFC/mL, padrão que não foi observado para nenhum dos demais isolados. Considerando a

sobrevivência entre T5 e T6, T1(2m) foi classificado na categoria 2, apresentando diferença no número de células viáveis inferior a 500 mil UFC/mL. Foi o único isolado que apresentou resultado positivo para mais de um dos testes para triagem de produtores de biossurfactantes, embora com apenas uma das duplicadas: uma ao promover o deslocamento de óleo, e outra ao produzir 63% de emulsão no teste IE24.

O isolado X1(2m), também identificado como *Bacillus* sp., apresentou um único evento de incremento populacional no cultivo em BTX, resultando em um desempenho de 17%. Observa-se, porém, que este foi o único isolado a responder com um incremento no número de células dois dias após a inoculação em meio contendo BTX, além de estar entre os isolados com menor redução no número de células viáveis entre 10 (T5) e 30 (T6) dias de cultivo (variação de  $1,70 \times 10^5$  UFC/mL; categoria 2). Nenhum resultado positivo foi obtido a partir dos testes indicativos da produção de biossurfactantes.

O isolado X2(2m), identificado como *Staphylococcus warneri*, apresentou desempenho razoável no cultivo em BTX (33%), com dois eventos de incremento celular (em T3 e T4, respectivamente). Aos 30 dias de cultivo (T6), X2(2m) apresentou queda considerável no número de células ( $2,85 \times 10^6$  UFC/mL), resultando em sua classificação na categoria 4. Nenhum resultado positivo foi obtido a partir dos testes indicativos da produção de biossurfactantes.

O isolado X3(2m) foi identificado como pertencente ao gênero *Bacillus* sp. Na avaliação de crescimento em BTX, este isolado apresentou desempenho intermediário ao longo do monitoramento (33%), sendo registrados dois eventos de aumento no número de células (em T4 e T6, respectivamente). Aos 30 dias de monitoramento (T6), foi a linhagem melhor avaliada (categoria 1), sendo inclusive a única a apresentar acréscimo celular ( $5 \times 10^4$  UFC/mL). Com relação a produção de biossurfactantes, ambas as duplicatas testadas foram positivas no teste de deslocamento de óleo.

O isolado X4(2m) foi identificado como *Bacillus safensis* e teve desempenho no cultivo em BTX avaliado em 17% (apresentou apenas um registro de crescimento no número de células durante o período de monitoramento). Considerando a diferença entre 10 (T5) e 30 (T6) dias de cultivo, X4(2m) foi classificado na categoria 2, com diferença observada de  $4,20 \times 10^5$  UFC/mL. Nenhum dos testes indicativos da produção de biossurfactantes gerou resultados positivos.

Finalmente, de acordo com o sequenciamento realizado, o isolado X5(2m) foi identificado como pertencente a espécie *Brevibacillus reuszeri*. Como já mencionado, devido a baixa sobrevivência na presença de BTX, este isolado foi desconsiderado das análises. Com

relação aos testes indicativos da produção de biossurfactantes, uma de suas duplicatas foi capaz de promover o deslocamento de óleo, mas outros resultados positivos não foram observados.

## 6 DISCUSSÃO

Por meio da técnica de enriquecimento com BTX em meio de cultura mineral mínimo, este trabalho buscou isolar e identificar linhagens de bactérias que pudessem ser empregadas em estratégias de biorremediação destes compostos. Presume-se que os 10 isolados obtidos sejam capazes de utilizar pelo menos algum dos hidrocarbonetos monoaromáticos avaliados como fonte de crescimento, inferindo indiretamente que tem potencial para degradá-los.

A área da qual as amostras estudadas são provenientes foi contaminada artificialmente em 2008 utilizando-se uma mistura de diesel petroquímico (80%) e biodiesel (20%). Apesar da expectativa de se encontrar microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, dado o histórico de contaminação (LEE et al., 1994; OH et al., 1994; LEE et al., 2002; ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005; MARIANO, 2006; TEIXEIRA, 2007; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008; MORALES, 2008; CERQUEIRA & COSTA, 2009), é importante mencionar que dentre os compostos presentes no diesel e biodiesel há substratos de mais fácil metabolização microbiológica que os BTX (VAN HAMME et al., 2003; MARIANO, 2006; TEIXEIRA, 2007).

Hidrocarbonetos monoaromáticos costumam ser biodegradados com mais dificuldade que n-alcanos (BRITO et al., 2010), o que talvez explique, em parte, porque dos 131 isolados obtidos por Morales (2008) a partir do enriquecimento com gasolina comercial, apenas 42 foram capazes de crescer utilizando misturas de BTX como única fonte de carbono. A fração referente ao biodiesel também representa um substrato de mais fácil metabolização, inclusive em relação ao diesel petroquímico. Por ser originado principalmente de ácidos graxos e cadeias carbônicas ligadas a moléculas de oxigênio, os componentes presentes no biodiesel são mais facilmente reconhecidos e degradados pelos microrganismos (MARIANO et al., 2008).

Apesar da menor probabilidade de identificação de bactérias biodegradadoras de BTX na área, optou-se por manter a prospecção voltada à degradação destes compostos em razão da preocupação relacionada ao seu elevado potencial de contaminação ambiental (DÍAZ, 2004; MARIANO, 2006; CAO et al., 2009; ABURTO & PEIMBERT, 2011; PRAKASH et al., 2014) e riscos à saúde (TEIXEIRA, 2007; CAO et al., 2009; BRITO et al., 2010). Embora não tenham sido utilizados métodos de mensuração de BTX para quantificar sua degradação pelos diferentes isolados, a contagem de células viáveis permite atestar sua capacidade de sobrevivência na presença dos contaminantes. Além disso, diversos autores já demonstraram que hidrocarbonetos BTX podem ser utilizados como fonte de crescimento, e que seu decaimento pode ser acompanhado pelo incremento de células durante a biodegradação (OH

et al., 1994; SPILBORGHS, 1997; LEE et al., 2002; MARIANO, 2006; BENCHOUK & CHIBANI, 2016).

Após o experimento de enriquecimento com BTX e triagem molecular por meio de PCR da região BOX, foram selecionados 10 isolados para dar continuidade a pesquisa. Destes, sete são provenientes da amostra referente a 2 metros de profundidade e três da amostra referente a 3 metros de profundidade. Uma possível explicação para estes resultados é que, de modo geral, águas subterrâneas tendem a possuir menor quantidade de matéria orgânica e, conseqüentemente, menos microrganismos em quantidade e em diversidade (BOOPATHY, 2000). Além disso, considerando que a biodegradação de BTX é em sua maioria aeróbia, é possível que a diferença encontrada entre os dois extratos seja decorrente de uma menor concentração de oxigênio dissolvido a medida que se avança para regiões mais profundas no aquífero (JAZEN et al., 2008; SOUZA et al., 2008).

Dentre os hidrocarbonetos utilizados no estudo, embora o tolueno seja descrito como o de mais fácil degradação (SILBORGHS, 1997; LEE et al., 2002; CAO et al., 2009; ABURTO & PEIMBERT, 2011), ao final da triagem por meio da BOX-PCR apenas um isolado sobreviveu a partir do enriquecimento com este composto (T1(2m)), em comparação com outros 4 por meio do enriquecimento com benzeno e 5 do enriquecimento com xileno. Ao estudar 56 isolados utilizando BTX como substrato de crescimento, Morales (2008) verificou que 30 foram capazes de utilizar tolueno como única fonte de carbono, 23 foram capazes de utilizar xileno, e 17 foram capazes de utilizar benzeno. Em um padrão semelhante, Prakash et al. (2014) identificaram 17 isolados capazes de crescer na presença de benzeno como única fonte de carbono, 15 na presença de tolueno, e 13 na presença de xileno.

Dos 8 isolados identificados por meio de sequenciamento de parte do gene RNAr 16S, quatro espécies pertencem ao gênero *Bacillus*. Este resultado condiz com o esperado, já que espécies deste gênero estão entre as mais estudadas para fins de biorremediação de derivados de petróleo. Há estudos investigando seu potencial de biodegradação de petróleo cru (CERQUEIRA et al., 2011; UDGIRE et al., 2015; PATOWARY et al., 2016; OYETIBO et al., 2017), de óleo diesel (ABIOYE et al., 2012; PRAKASH et al., 2014; FOSSO-KANKEU et al., 2017; LIMA et al., 2018) e de hidrocarbonetos BTX (MARIANO, 2006; PRAKASH et al., 2014; LIMA et al., 2018). Bento et al. (2003) também encontraram grande representatividade de *Bacillus* spp. ao estudar a degradação de TPH em solos contaminados com óleo diesel, onde de 6 linhagens isoladas, 4 pertenciam a este gênero.

No presente estudo, foram identificados como *Bacillus* sp. os isolados T1(2m), X1(2m) e X3(2m). T1(2m) se mostrou um bom candidato para aplicação na remediação de contaminações de BTX, sendo quem apresentou maior número de eventos de incremento de biomassa ao longo do monitoramento com os contaminantes, além de mostrar indícios da produção de biossurfactantes em dois testes (deslocamento de óleo e IE24). X3(2m) também se mostrou um bom candidato, sendo o único a apresentar crescimento populacional após 30 dias na presença de BTX, além de apresentar indicativos da produção de biossurfactantes por meio do teste de deslocamento de óleo.

Embora não tenha respondido positivamente a nenhum dos testes, o isolado X1(2m) se mostrou bastante resistente aos contaminantes, tanto pelo crescimento populacional observado nas primeiras 48 horas na presença de BTX, quanto pela queda populacional pouco expressiva em comparação com as demais espécies ao final de 30 dias de cultivo. A elevada tolerância de *Bacillus* a contaminantes altamente recalcitrantes os coloca entre as espécies mais promissoras para a degradação de hidrocarbonetos (PRAKASH et al., 2014). Além disso, possuem considerável versatilidade metabólica e capacidade de formação de esporos, o que lhes confere vantagem adaptativa em uma variedade de ambientes (FONSECA et al., 2015; FOSSO-KANKEU et al., 2017; OYETIBO et al., 2017).

Oyetibo et al. (2017) isolaram duas linhagens de *B. subtilis* que além de utilizar hidrocarbonetos (óleo cru e fenantreno) como única fonte de carbono foram capazes de crescer em ambiente com elevada concentração de níquel e cobalto, inclusive diminuindo a concentração destes metais no meio. Prakash et al. (2014) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas* e um *Bacillus* capazes de metabolizar diesel e benzeno. Por meio da utilização de um consórcio contendo *B. cereus* e *B. pumilus*, Patowary et al. (2016) verificaram a degradação de 84,15% de TPH a partir de petróleo cru após 5 semanas de incubação.

O isolado X4(2m) foi identificado como *Bacillus safensis*, o qual apresentou capacidade de sobrevivência em BTX semelhante a X1(2m), e assim como este último, não apresentou resultados positivos em nenhum dos testes indicadores da produção de biossurfactantes. O prefixo “saf” de *safensis* remete ao local onde a espécie foi encontrada pela primeira vez, em uma instalação de montagem de naves espaciais da NASA (do inglês, *Spacecraft Assembly Facility*) (SATOMI et al., 2006). A espécie já foi encontrada também no solo de um deserto na Mongólia (RAJA & OMINE, 2012), associada a raízes de tubérculos na Índia (SINGH et al., 2013), e em leite condensado contaminado na Espanha (ABRIL et al., 2019). No Brasil, *Bacillus safensis* (*B. safensis* CFA-06) foi isolado por Angolini (2014) no Campo Petrolífero de Pintassilgo, na Bacia Potiguar (RN). Estudos posteriores do perfil

enzimático da cepa identificaram duas oxidoredutases, uma classe de enzimas de grande importância na degradação de petróleo, sendo uma delas registrada pela primeira vez (FONSECA et al., 2015).

O segundo grupo mais representativo encontrado nas amostras pertence ao gênero *Staphylococcus*, sendo um oriundo do enriquecimento com benzeno (B2(3m)) e outro do enriquecimento com xileno (X2(2m)). B2(3m) foi identificado como *S. xylosus*, e além de apresentar resultados negativos em todos os testes em busca de biossurfactantes, apresentou o pior desempenho dentre todos os isolados durante o crescimento em BTX.

*Staphylococcus xylosus* é descrito como um microrganismo comensal da pele de mamíferos e aves (NAGASE et al., 2002), e também costuma estar associado a alimentos crus, principalmente carnes e leites (DORDET-FRISONI et al., 2007). Devido a presença de enzimas proteolíticas e lipolíticas, microrganismos da espécie costumam ser utilizados como cultura inicial para a produção de embutidos (FIORENTINI et al., 2010; MARQUES, 2013).

Duas linhagens de *S. xylosus* foram isoladas de fermentado de peixe na Tailândia (NAMWONG & TANASUPAWAT, 2014), uma das quais com capacidade de utilizar diferentes tipos de óleo como substrato de crescimento, tais como óleo de girassol, palma, soja, e óleo cozinha. A cepa também demonstrou tolerância a elevada concentração de sal no meio de cultura (20%) e capacidade de produção de biossurfactantes. Considerando os resultados obtidos, os autores sugerem o uso da linhagem em estratégias de recuperação avançada de óleo (MEOR, *microbial enhanced oil recovery*).

A espécie também já foi isolada a partir de solo contaminado com óleo de motor na Turquia, e resultados obtidos pelo teste IE24 indicaram a produção de biossurfactantes pelo isolado, onde se observou a produção de 40% de emulsão na presença de óleo de girassol, 60% na presença de óleo de motor, e 50% na presença de querosene e benzeno (KESKIN et al., 2015).

Marques (2013) aponta o potencial de uso *S. xylosus* para a produção de biodiesel, em razão da presença de lipases, a partir de resíduos animais gerados na indústria de alimentos. Em seus estudos, o autor verificou que seu uso na fermentação de gordura animal foi eficaz em reduzir o ponto de fusão dos ácidos graxos entre 21 °C e 30 °C, o que representa redução de custos e aumento de rendimento durante a fase de liquefação de gorduras relacionada a produção de biodiesel.

Com base na literatura apontada e associação de *S. xylosus* a biodegradação de substratos oleosos, embora os resultados encontrados no presente trabalho sejam negativos em relação a degradação de BTX, a presença desta espécie nas amostras pode estar associada a

metabolização de fontes de carbono mais facilmente degradáveis. Como já apontado anteriormente, os demais componentes presentes no diesel e biodiesel são substratos mais simples, em comparação com hidrocarbonetos monoaromáticos, e representam uma fonte de energia mais facilmente assimilável pelos microrganismos. Além disso, *S. xylosus* provém de uma amostra coletada a 3 metros de profundidade, onde a disponibilidade de oxigênio é provavelmente menor que em áreas mais superficiais do aquífero.

O metabolismo fermentativo de *S. xylosus* pode ser resultado de uma adaptação a condições de anaerobiose (DORDET-FRISONI et al., 2007). Embora seja unânime que a degradação de hidrocarbonetos pela via aeróbia seja mais rápida e comum (LEAHY & COLWELL, 1990; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; SANTOS, 1996; ICSS, 2006; ATLAS & HAZEN, 2011; MARTINS, 2015), a degradação anaeróbia não deve ser subestimada (ICSS, 2006). Se confirmada sua capacidade de degradação de derivados de petróleo em anaerobiose, *S. xylosus* poderia ser bastante útil em estratégias de biorremediação em ambientes pobres em oxigênio.

Outra espécie de *Staphylococcus* identificada é *S. warneri*, correspondente ao isolado X2(2m). Assim como *S. xylosus*, também é um microrganismo comensal da pele de mamíferos e aves, embora comparativamente habite menor variedade de animais (DORDET-FRISONI et al., 2007). Embora com os experimentos realizados não tenham sido encontrados indicativos de que *S. warneri* produza biossurfactantes, o isolado foi um dos que melhor sobreviveu na presença de BTX (desempenho de 33%). Seu potencial para aplicação em estratégias de biorremediação de derivados de petróleo já foi atestado por outros autores. Isolados de *S. warneri* já foram encontrados em solo contaminado com óleo em um porto de exportação de petróleo no Irã (GODINI et al., 2018), e há registros da associação da espécie na degradação de TPH em condições anóxicas em sistema de biorreator utilizado no tratamento de efluentes contaminados com resíduos de petróleo (MOUSSAVI & GHORBANIAN, 2015).

O isolado B1(2m), identificado como *Leifsonia* sp., ficou entre os que menos sobreviveu na presença de BTX, apesar de uma de suas duplicatas apresentar atividade de deslocamento de óleo. Sua baixa sobrevivência pode ser explicada pela elevada exigência nutricional característica do gênero *Leifsonia*, além da incapacidade de formação de esporos de resistência (LYUDMILA et al., 2000). Ainda assim, o gênero já foi encontrado em ambientes contendo petróleo. Uma linhagem foi isolada por Wu et al. (2020) a partir de solo contaminado com óleo cru, na China. Ao avaliar os efeitos da técnica de fertirrigação (irrigação associada ao uso de fertilizantes), os autores especulam que a presença de *Leifsonia*, juntamente com outros microrganismos identificados, pode estar correlacionada ao aumento

da degradação de TPH, HPAs e compostos aromáticos. Há também estudos que avaliam o potencial de uso de *Leifsonia* na biorremediação de efluentes contendo cafeína (AHMAD et al., 2015).

A oitava espécie que pôde ser identificada é *Brevibacillus reuszeri*, correspondente ao isolado X5(2m), que foi desconsiderado das análises relacionadas ao crescimento em BTX devido a sua baixa sobrevivência, apesar de uma de suas duplicatas ter promovido deslocamento de óleo. *Brevibacillus* spp. já foram encontrados em solo contaminado com petróleo (GODINI et al., 2018) e em amostras de lama contaminadas com hidrocarbonetos (REDDY et al., 2010). Neste último, verificou-se que a linhagem foi capaz de degradar 93% de fenantreno em 6 dias de incubação, além de mostrar indícios da produção de biosurfactantes por meio da produção de 57% de emulsão no teste IE24 e redução da tensão superficial do meio de 70 mN•m<sup>-1</sup> para 47 mN•m<sup>-1</sup>.

Muhonja et al. (2018) isolaram 16 bactérias a partir de solo coletado de um aterro sanitário, no Kenia. Das 16, uma linhagem de *Bacillus cereus* e uma de *Brevibacillus borstelensis* destacaram-se pela capacidade de degradação de polietileno de baixa densidade, um plástico feito a partir de petróleo. A análise do genoma de *B. borstelensis* mostrou conter genes para a síntese de diversas enzimas potencialmente importantes para a degradação de plásticos (hidroxilases, lipases, cutinases, etc), além de genes para a codificação de pelo menos 159 monooxigenases e 136 dioxigenases (KHALIL et al., 2018), enzimas conhecidamente fundamentais à degradação de hidrocarbonetos de petróleo (LEAHY & COLWELL, 1990; ATLAS, 1995; BOOPATHY, 2000; TEIXEIRA, 2007; HASSANSHAHIAN & CAPELLO, 2013).

Benchouk & Chibani (2016) avaliaram a capacidade de degradação de diesel por *P. aeruginosa* e *Brevibacillus laterosporus* isolados de solo contaminado com óleo, e observaram que a primeira se mostrou muito mais eficaz. Além de degradar maior diversidade de hidrocarbonetos, *P. aeruginosa* foi capaz de crescer utilizando benzeno, etilbenzeno, orto-xileno e tolueno, enquanto *B. laterosporus* cresceu apenas utilizando tolueno como fonte de carbono.

Supõe-se que a cepa de *B. reuszeri* encontrada, assim como no caso de *S. xylosum* (B2(3m)), apresente capacidade de degradação da fração quimicamente mais simples de hidrocarbonetos presentes no diesel e biodiesel. Além disso, é importante considerar que em ambos os casos a mistura e/ou a quantidade de BTX utilizada pode ter sido tóxica aos microrganismos (MORALES, 2008), sendo necessários novos estudos para avaliação de diferentes combinações e concentrações dos compostos.

Os isolados B3(3m) e B1(3m) não puderam ser identificados geneticamente em razão da baixa qualidade do sequenciamento, sendo ambos caracterizados como bactérias cocos Gram negativas. É interessante observar que das 10 linhagens estudadas, apenas estes dois isolados pertencem a este grupo. Sua baixa representatividade, no entanto, parece estar associada ao tipo de amostra utilizada. Como pode-se observar na Tabela 2, elaborada a partir da revisão de diferentes estudos relacionados à biodegradação de HC de petróleo, tanto bactérias Gram negativas quanto Gram positivas são encontradas com mais frequência em amostras de solo.

B3(3m) se destacou pela produção de 43% de emulsão por uma das duplicatas analisadas, juntamente com T1(2m) (*Bacillus* sp.), que produziu 63% de emulsão no teste IE24. O uso de microrganismos com capacidade emulsificante em estratégias de biorremediação é interessante porque a segregação de compostos hidrofóbicos em gotículas menores gera novas superfícies disponíveis ao processo de biodegradação (GALLEGO et al., 2001; ICSS, 2006; TEIXEIRA, 2007; MELO & AZEVEDO, 2008). É possível que a ausência de produção de emulsão pelos demais isolados seja devido a utilização do sobrenadante na realização do teste, ao invés da cultura celular. Morales (2008) verificou que, de 109 isolados investigados, 37% foram capazes de produzir emulsão quando o teste foi realizado na presença de células, em comparação com 24% quando se utilizou apenas o sobrenadante. Ao realizar o teste com a cultura na presença e ausência de células, Cerqueira et al. (2011) observaram que a porcentagem de emulsificação diminuiu de 55,1% para 47,8%. Novos testes com os isolados que foram negativos para IE24, na presença de células, poderiam elucidar melhor seu potencial na geração de emulsões.

O isolado B1(3m), embora não tenha se destacado no cultivo contendo BTX, foi o único que demonstrou capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultura, indicando assim o potencial de produção de biossurfactantes de baixo peso molecular. Esta redução foi mais acentuada quando o isolado foi cultivado em meio com óleo de soja suplementado com 1% de caldo nutriente, onde a tensão superficial mensurada foi de 34,70 mN•m<sup>-1</sup>. De acordo com a literatura consultada, nos cenários mais exigentes são considerados bons produtores de biossurfactantes os microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 35 mN•m<sup>-1</sup> (PATOWARY et al., 2016).

Teixeira (2007) verificou a redução da tensão superficial por *P. putida* e *P. aeruginosa* cultivados na presença de gasolina de 70,2 mN•m<sup>-1</sup> para 44,4 mN•m<sup>-1</sup> e 40,6 mN•m<sup>-1</sup>, respectivamente, no período de 24 horas. Reddy et al. (2010) constataram a redução da tensão superficial por *Brevibacillus* sp. de 70 mN•m<sup>-1</sup> para 47,4 mN•m<sup>-1</sup> após 60 horas de incubação

na presença de fenantreno. Após 40 dias de cultivo em meio contendo lodo oleoso como fonte de carbono, Cerqueira et al. (2011) observaram a maior redução da tensão superficial do meio pelo consórcio microbiano utilizado, a qual foi mensurada em  $36,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

Como pode-se observar, a diminuição da tensão superficial por B1(3m) é um resultado bastante promissor. Além disso, considerando-se a ampla versatilidade de usos de biossurfactantes, B1(3m) pode ser explorado para outras finalidades biotecnológicas além de estratégias de biorremediação (WALTER et al., 2010; ROY, 2017).

Os resultados obtidos a partir das 10 linhagens isoladas indicam que a área do Núcleo Ressacada de Pesquisas em Meio Ambiente, pertencente ao REMA-UFSC, de onde as amostras são provenientes, possui microrganismos capazes de sobreviver na presença de BTX. As oscilações populacionais observadas ao longo do tempo podem ter ocorrido devido a transferência das culturas do caldo nutriente, um meio rico, para o meio mínimo contendo BTX, exigindo-se um período de adaptação e indução enzimática previamente ao crescimento celular (TEIXEIRA, 2007; FOSSO-KANKEU et al., 2017). Declínios populacionais também podem ter ocorrido pela ausência de enzimas de degradação (MARIANO, 2006; MORALES, 2008; CAO et al., 2009), pela toxicidade dos compostos quando presentes em mistura (LEE et al., 2002; ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008; ABURTO & PEIMBERT, 2011), ou mesmo pela concentração utilizada (OH et al., 1994; ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005; MARIANO, 2006; LITTLEJOHNS & DAUGULIS, 2008). Ainda, embora alguns isolados tenham mostrado indícios de produção de biossurfactantes, testes utilizando uma maior variedade de condições experimentais e substratos de crescimento poderiam ser mais informativos (BENTO et al., 2008; WALTER et al., 2010; ROY, 2017).

## 7 CONCLUSÕES

Partindo-se do pressuposto que durante o cultivo em BTX os 10 isolados avaliados apresentaram células viáveis, conclui-se que todos possuem algum tipo de tolerância a estes contaminantes. Adicionalmente, considerando que o aumento no número de células entre diferentes tempos de monitoramento são indícios de capacidade de biodegradação, pode-se afirmar que todos os isolados, exceto B1(2m) (*Leifsonia* sp.) e B2(3m) (*Staphylococcus xylosum*), são capazes de metabolizar pelo menos um, dos três compostos monoaromáticos.

Os gêneros mais representativos encontrados nas amostras são *Bacillus* e *Staphylococcus*. A partir do enriquecimento utilizando BTX, o gênero *Bacillus* se mostrou mais diverso, com quatro linhagens distintas (T1(2m), X1(2m) e X3(2m), todos *Bacillus* sp., e X4(m), *Bacillus safensis*), enquanto somente duas espécies de *Staphylococcus* foram identificadas (B2(3m), *S. xylosum*, e X2(2m), *S. warneri*).

Finalmente, com base no resultado dos testes para a produção de biossurfactantes, três isolados mostraram potencial para a produção de tais substâncias. Considerando a geração de emulsão observada no teste IE24, presume-se que B3(3m) (cocos Gram negativa) e T1(2m) (*Bacillus* sp.) tenham capacidade de produzir biossurfactantes de alto peso molecular. Devido a diminuição da tensão superficial do meio de cultura observada a partir de B1(3m) (cocos Gram negativa), supõe-se que este isolado tenha capacidade de produzir biossurfactantes baixo peso molecular.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Seguem adiante algumas sugestões para trabalhos futuros utilizando as linhagens isoladas no presente estudo, as quais podem acrescentar considerável contribuição científica no que se refere à biodegradação de hidrocarbonetos BTX:

- Quantificar a degradação de BTX pelos isolados: experimentos que permitam a mensuração de BTX pelos isolados ao longo do tempo podem auxiliar na identificação de quais compostos são mais facilmente metabolizados pelas diferentes linhagens;
- Testar diferentes combinações e concentrações de BTX em experimentos de biodegradação: o uso de diferentes combinações e concentrações de BTX pode contribuir para um melhor entendimento de como as misturas destes compostos afetam sua biodegradação, além de permitir a identificação da concentração mínima e máxima tolerável para a sobrevivência dos isolados;

- Identificar os isolados B1(3m) e B3(3m) por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S: sendo os únicos isolados pertencentes ao grupo de bactérias Gram negativas, a identificação de B1(3) e B3(3m) seria interessante do ponto de vista da diversidade de espécies encontradas na amostra. Além disso, B1(3m) foi a linhagem com os resultados mais promissores com relação a produção de biossurfactantes de baixo peso molecular, sendo a única a reduzir a tensão superficial do meio de cultura;
- Testar a capacidade de biodegradação pelos isolados de outros hidrocarbonetos presentes no óleo diesel e biodiesel: como já sugerido anteriormente, o óleo diesel e biodiesel contém HC de estrutura química mais simples que os BTX, principalmente alcanos. Portanto, testar maior variedade de HC em experimentos de biodegradação poderia elucidar melhor o papel ecológico dos isolados no processo de metabolização destes combustíveis;
- Realizar testes de biodegradação utilizando consórcios criados a partir de combinações das linhagens isoladas: o presente estudo avaliou o crescimento dos isolados sempre em condição de cultura pura. No entanto, experimentos de biodegradação utilizando diferentes combinações de isolados poderiam auxiliar na definição do consórcio com o qual se alcancem os melhores resultados de degradação;
- Utilizar outros substratos para avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes pelos isolados: os estudos de triagem realizados ao longo da pesquisa utilizaram somente o óleo de soja como substrato estimulante da produção de biossurfactantes. Outros experimentos que considerem maior variedade de substratos podem apresentar resultados diferentes;
- Realizar o teste IE24 com outras substâncias oleosas e utilizando a cultura com e sem células: assim como apresentado para o item anterior, o emprego de outras substâncias no teste IE24, que não o óleo de soja, poderiam gerar resultados distintos. Além disso, o teste foi realizado somente utilizando a cultura livre de células, o que eventualmente pode ter interferido nos resultados encontrados;
- Identificar os biossurfactantes produzidos por B1(3m) (cocos Gram negativa), B3(3m) (cocos Gram negativa) e T1(2m) (*Bacillus* sp.): considerando que biossurfactantes tem potencial para diversas finalidades biotecnológicas, recomenda-se a realização de outros estudos que contemplem sua potencial produção pelos isolados acima mencionados, assim como sua identificação.

## REFERÊNCIAS

- ABIOYE, P. O.; AZIZ, A. A.; AGAMUTHU, P. Enhanced Biodegradation of Used Engine Oil in Soil Amended with Organic Wastes. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 209, p. 173 – 179, 2010.
- ABRIL, A. G. et al. *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 189 – 195, 2019.
- ABUHAMED, T. et al. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 983 – 988, 2004.
- ABURTO, A.; PEIMBERT, M. Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 553 – 562, 2011.
- ADAMS, G. O. et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28 – 39, 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2019. **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Brasil, 2019.
- AHMAD, S. A. et al. Biodegradation kinetics of caffeine by *Leifsonia* sp. strain siu. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, i. 2, p. 312 – 316, 2015.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIN, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17 – 43, 2010.
- ANGOLINI, C.F. F. Estudos de caso em petróleo: biodegradação e origem. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 115p., 2014.
- ARIAS, M. E. et al. Soil health – a new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, v. 8, p. 13 – 21, 2005.
- ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. Substrate Interactions during Aerobic Biodegradation of Benzene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3221 – 3225, 1989.
- ATLAS, R. M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4 – 12, p. 178 – 182, 1995.
- \_\_\_\_\_ & HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U. S. History. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 6709 – 6715, 2011.

- BENCHOUK, A.; CHIBANI, A. Biodegradation of diesel and isomerate by *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacillus laterosporus* isolated from hydrocarbon contaminated soil. **Advances in Environmental Biology**, v. 10, n. 7, p. 208 – 215, 2016.
- BENDIA, A. G. et al. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. **Extremophiles**, v. 22, p. 917 – 929, 2018.
- BENTO, F. M. et al. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, s. 1, p. 65 – 68, 2003.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; GAYLARDE, C. C. Biossurfactantes, Capítulo 7, p. 151 – 184. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª edição revista e ampliada. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647p., 2008.
- BERRY, D.; GUTIERREZ, T. Evaluating the Detection of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in 16S rRNA Gene Sequencing Surveys. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 896, p. 1 – 6, 2017.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63 – 67, 2000.
- BRASIL, **Resolução CONAMA nº 273**, de 29 de novembro de 2000. Diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços. Publicado no D.O.U. de 8 de janeiro de 2001.
- BRASIL, **Resolução CONAMA nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Publicado no D.O.U. de 30 de dezembro de 2009.
- BRITO, G. C. B. et al. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, n. 3, p. 291 – 310, 2010.
- CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. C. Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 207 – 228, 2009.
- CERQUEIRA, V. S. et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11003 – 11010, 2011.
- CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 394 – 400, 2009.
- CIOTTI, C. S. et al., Acidente Ecológico na Baía de Guanabara: o direito ambiental e a tragédia envolvendo sua sustentabilidade. **III Encontro de Sustentabilidade em Projeto do Vale do Itajaí**, 8p., 2009. Disponível em: <https://enssus2009.paginas.ufsc.br/files/2015/09/ACIDENTE-ECOL%C3%93GICO-NA-BAIA-DE-GUANABARA-UPF.pdf> Acesso em: 08 out 2019.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Histórico. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/historico/> Acesso em: 27 set 2019.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p. 224 – 229, 1987.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: Effect of ethanol. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7 – 8, p. 311 – 318, 1996.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. São Paulo: **Blucher**, 2011.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **International Microbiology**, v. 7, p. 173 – 180, 2004.

DORDET-FRISONI, E. et al. Genomic Diversity in *Staphylococcus xilosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7199 – 7209, 2007.

DUARTE, R. T. D. Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e *permafrost* polares. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 201p., 2010.

ELDIN, A. M.; KAMEL, Z.; HOSSAM, N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 309 – 314, 2019.

FIORENTINI, A. M. et al. Influence of a Native Strain of *Staphylococcus xylosus* on the Microbiological, Physicochemical and Sensorial Characteristics on Milano Salami Type. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 961 – 974, 2010.

FONSECA, F. S. A. et al. Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 152 – 159, 2015.

FOSSO-KANKEU, E.; MARX, S.; BRINK, A. Adaptation behaviour of bacterial species and impact on the biodegradation of biodiesel-diesel. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 469 – 480, 2017.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v. 12, p. 325 – 335, 2001.

GARCÍA-REYES, S.; YANEZ-OCAMPO, G. Microbial Biosurfactants: Methods for their Isolation and Characterization. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 641 – 648, 2016.

GODINI, K. et al. Isolation and Identification of new strains of crude oil degrading bacteria from Kharg Island, Iran. **Petroleum Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1 – 6, 2018.

GOUVEIA, J. L. N.; NARDOCCI, A. C. Acidentes em Postos e Sistemas Retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 317 – 324, 2007.

GRADY, C. P. L. Biodegradation: Its Measurement and Microbiological Basis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXVII, p. 660 – 674, 1985.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Precipitation of DNA with Ethanol. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor Protocols, p. 1116 – 1120, 2016. doi: 10.1101/pdb.prot093377

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379 – 387, 2000.

HASSANSHAHIAN, M.; CAPPELLO, S. Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. In: CHAMY, R. (Editor) **Biodegradation: Engineering and Technology**. 475p., 2013.

HEALY, M. G., DEVINE, C. M., & MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, n. 1 – 4, p. 41 – 57, 1996.

ICSS. **MANUAL FOR BIOLOGICAL REMEDIATION TECHNIQUES**. International Centre for Soil and Contaminated Sites: funded by the German Ministry of Education and Research. Dessau, GE, 81p, 2006.

JAZEN, J. G.; SCHULZ, H. E.; LAMON, A. W. Medidas da concentração de oxigênio dissolvido na superfície da água. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 13, n. 3, p. 278 – 283, 2008.

KAPLAN, I. R.; GALPERIN, Y.; LU, S; LEE, R. Forensic Environmental Geochemistry: Differentiation of fuel-types, their sources and release time. **Organic Geochemistry**, v. 27, n. 5 – 6, p. 289 – 317, 1997.

KESKIN, N. O. S. et al. Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly isolated *staphylococcus xylosus* STF1 from petroleum contaminated soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 133, p. 689 – 694, 2015.

KHALIL, A. B. et al. Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through Whole Genome Sequencing: A Thermophilic Bacterium Isolated from a Hot Spring in Saudi Arabia. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1 – 9, 2018.

LANE, D. J. et al. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., (Eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: **John Wiley and Sons**, p. 115-175, 1991.

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

- LEE, E. Y. et al. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 52, p. 400 – 406, 2002.
- LEE, J.; ROH, J.; KIM, H. Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* for the Simultaneous Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene Mixture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1146 – 1152, 1994.
- LIMA et al. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, p. 1 – 8, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.208611>
- LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1068–1076, 2008.
- LYUDMILA, I. E. et al. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of '*Corynebacterium aquaticum*' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 371 – 380, 2000.
- MARIANO, A. P. Avaliação do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminadas com Óleo Diesel. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo, 125p., 2006.
- \_\_\_\_\_ et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1223 – 1228, 2008.
- MARQUES, R. V. Modificação de resíduos graxos animais através de cepas de *Staphylococcus xylosus*: Matéria-prima para biodiesel. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 63p., 2013.
- MARTINS, C. P. Avaliação da biodegradação de compostos BT da gasolina, com e sem a adição de etanol, em solos de gnaiss por meio de ensaios em colunas. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 140p., 2015.
- McCAIN, J. **The Properties of Petroleum Fluids**. Second ed. Tulsa, Oklahoma: PennWell Books, 1989.
- MELO, C. L. et al. Contaminação do Lençol Freático pelo Vazamento de Óleo na Refinaria Presidente Getúlio Vargas - REPAR, Município de Araucária, Paraná. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 8, n. 1, p. 13 – 19, 2003.

- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Estratégias de isolamento de microrganismos envolvidos na degradação de xenobióticos, Capítulo 9, p. 199-216. *In*: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, 647p, 2008.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732 – 749, 1983.
- MORALES, D. L. Biodegradação da fração BTX e etanol da gasolina comercial e da gasolina pura por microrganismos isolados de locais impactados. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 118p., 2008.
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A Study on the Structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211 – 218, 2000.
- MOUSSAVI, G.; GHORBANIAN, M. The biodegradation of petroleum hydrocarbons in an upflow sludge-blanket/fixed-film hybrid bioreactor under nitrate-reducing conditions: Performance evaluation and microbial identification. **Chemical Engineering Journal**, v. 280, p. 121 – 131, 2015.
- MUHONJA, C. N. et al. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi- Kenya. **Plos One**, v. 13, n. 7, p. 1 – 17, 2018.
- NAGASE, N. et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 245 – 250, 2002.
- NAMWONG, S.; TANASUPAWAT, S. Identification of *staphylococcus* strain CH 1-8 and its oil degradation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 11, p. 24 – 29, 2014.
- NASCIMENTO, L. Manchas de óleo voltam a aparecer no litoral do Ceará. **Agência Brasil**, 2019. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2019-12/manchas-de-oleo-voltam-aparecer-no-litoral-do-ceara> Acesso em: 12 dez 2019.
- OH, Y. et al. Interactions Between Benzene, Toluene, and p-Xylene (BTX) During Their Biodegradation. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 44, p. 533 – 538, 1994.
- OTENIO, M. H. et al. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM1 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258 – 261, 2005.
- OYETIBO G. O. et al. Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 143 – 151, 2017.
- PATOWARY, K. et al. Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1 – 14, 2016.

- PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R. G. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável, Capítulo 4, p. 83 – 106. *In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental*. 2ª edição revista e ampliada. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647p., 2008.
- PEREIRA JR., N.; GOMES, E. B.; SORIANO, A. U. **Biodegradação de Hidrocarbonetos**. *In: Séries em Biotecnologia*, v.3, 1ª ed. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRAS; 2009.
- PRAKASH, A. S. et al. Biodegradation potential of petroleum hydrocarbons by bacteria and mixed bacterial consortium isolated from contaminated sites. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**, v. 38, p. 41–50, 2014.
- RAJA, C. E.; OMINE, K. Arsenic, boron and salt resistant *Bacillus safensis* MS11 isolated from Mongolia desert soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2267 – 2275, 2012.
- REDDY, M. S. et al. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7980 – 7983, 2010.
- RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93 – 100, 1999.
- ROY, A. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. **Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, v. 8, i., 8p, 2017.
- SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 19–25, 2004.
- SANTOS, R. C. F. Impacto do Etanol na Biodegradação de Compostos Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Aquíferos Contaminados por Derramamento de Gasolina. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 97p., 1996.
- SATOMI, M.; MYRON, D.; KASTHURI, V. *Bacillus safensis* sp nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1735 – 1740, 2006.
- SEABRA, P. N. Biorremediação de contaminações por petróleo e Derivados, Capítulo 24, p. 547 – 570. *In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental*. 2ª edição revista e ampliada. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647p., 2008.
- SELVAKUMAR, S.; SEKAR, P.; RAJAKUMAR, S.; AYYASAMY, P. M. Rapid Screening of Crude Oil Degrading Bacteria Isolated from Oil Contaminated Areas. **The Scitech Journal**, v. 01, n. 03, p. 24–27, 2014.

SHADI et al. Degradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) from aqueous solution by isolated bacteria from contaminated sites. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, n. 1, 11p, 2013.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. YADAV, M. Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of *Bacillus safensis* AS-08. **Biologia**, v. 68, n. 6, p. 1028 – 1033, 2013.

SOUZA, A. R. et al. Variação vertical do perfil de oxigênio dissolvido e temperatura da represa Samambaia, Goiânia/GO. 48º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, 2008.

SPILBORGHS, M. C. F. Biorremediação de Aquífero contaminado com hidrocarboneto. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 162p., 1997.

TEIXEIRA, A. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 82p., 2007.

TURNER, S. et al. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327 – 338, 1999.

UDGIRE, M.; SHAH, N.; JADHAV, M. Enrichment, Isolation and Identification of Hydrocarbon Degrading Bacteria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 6, p. 708 – 713, 2015.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VENOSA, A. D. et al. Bioremediation and biorestitution of a crude oil-contaminated freshwater wetland on the St. Lawrence river. **Bioremediation Journal**, v. 6, n. 3, p. 261–281, 2002.

VERSALOVIC, James et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, jan. 1994.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *In*: SEN, R. (eds) Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 672, **Springer**, New York, NY, 2010.

WATTS et al. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 76, n. 1, p. 73 – 89, 2000.

WETLER-TONINI, R. M. C. W.; DE REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010–1020, 2010.

\_\_\_\_\_. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 2, p. 78–87, 2011.

WORSEY, M. J.; WILLIAMS, P. A. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas (putida (arvilla) mt-2*: evidence for a new function of the TOL plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 1, p. 7–13, 1975.

WU, M. et al. Nutrient drip irrigation for refractory hydrocarbon removal and microbial community shift in a historically petroleum-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 713, p. 1 – 8, 2020.

YALÇIN, J. T.; ERGIN-TEPEBASI, G.; UYAR, E. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, p. 782 – 792, 2018.

ZOBELL, C. E. Action of Microorganisms on Hydrocarbons. **Bacteriology Reviews**, v. 10, p. 1 – 49, 1946.

ZYLSTRA et al. Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1: Genetic Organization of the *tod* Operon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1498 – 1503, 1988.

## ANEXOS

## ANEXO A – Meio Mineral

**Para cada 1 litro de água destilada estéril:**

Solução de sais 10 X	100 mL
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
1 M CaCl <sub>2</sub>	0.3 mL
Solução de elementos traço 100 X	10 mL

**Soluções estoque**

## Solução de sais 10 X

Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60.05 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/L
NaCl	5 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L

Ajustar pH para 7.2; esterilizar em autoclave.

1 M MgSO<sub>4</sub>

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24.65 g/L
--------------------------------------	-----------

Esterilizar em autoclave.

1 M CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14.70 g/L
--------------------------------------	-----------

Esterilizar em autoclave.

## Solução de elementos traço 100 X

EDTA	5 g/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.83 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	84 mg/L
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	13 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.6 mg/L

Ajustar pH para 7.5; esterilizar por filtração (0.22 µm).