

Aline Daniela Lopes Júlio

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE
SUPERFÍCIE E ENZIMAS DEGRADATIVAS DE HIDROCARBONETOS, COM
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

BELO HORIZONTE

2013

Aline Daniela Lopes Júlio

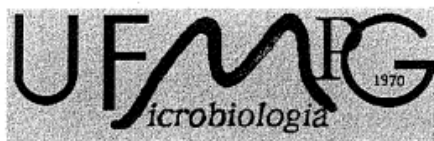
**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS ATIVOS DE
SUPEFÍCIE E ENZIMAS DEGRADATIVAS DE HIDROCARBONETOS, COM
POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia.*

Orientadora: Prof. Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE

2013



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: ALINE DANIELA LOPES JÚLIO

Nº matrícula: 2011662502

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL MESTRADO

Defesa de Dissertação: 08 de março de 2013

Título: "Prospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes e enzimas degradativas de hidrocarbonetos com potencial de utilização em processos de biorremediação"

A Dissertação foi submetida à apreciação do(a) Prof(a) Regina Maria Nardi Drummond que emitiu parecer favorável.

Andréa de Souza Monteiro
Dra. Andréa de Souza Monteiro
Examinadora

Aprovada: SIM

Péricles Leonardo Fernandes
Prof. Péricles Leonardo Fernandes
Examinador

Aprovada: Sim

Vera Lúcia dos Santos
Profa. Vera Lúcia dos Santos
Orientadora

Aprovada: SIM

Claudio Antonio Bonjardim
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Júlio,
sinônimos de amor e dedicação durante
toda essa jornada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À professora Dra. Vera Lucia dos Santos por todos os ensinamentos, paciência, apoio, carinho, por sempre estar disposta a me ajudar e por ter confiado em mim e dado a oportunidade de integrar a equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) para desenvolver esse trabalho.

À professora Dra. Regina Nardi Drumond por seu carinho, ensinamentos e boa vontade em me ajudar.

À professora Dra. Andréia Monteiro pelas sugestões, aconselhamentos e disponibilidade em contribuir para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Péricles Fernandes pela amizade, carinho, apoio durante a graduação e pós-graduação e por mais uma vez se disponibilizar em me ajudar e contribuir para a conclusão desse trabalho.

Ao Almir pela ajuda na coleta das amostras.

Ao professor Dr. Marcos Rogério Tótola e todo o Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia da UFV pela ajuda e por me permitirem realizar no laboratório parte da prospecção dos Compostos Ativos de Superfície.

À Bruna, Lair, professora Dra. Anita Marsaioli e demais integrantes do Laboratório de Síntese Orgânica do Departamento de Química da UNICAMP por terem me recebido tão bem, pelo carinho, amizade e pela ajuda inestimável na triagem enzimática dos isolados.

Aos amigos e colegas do LMA pela companhia diária, incentivo e por me proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho e muitos bons momentos.

Ao Vítor, Irany, Natália, Spencer e Gabriela, amigos que com certeza vou levar por toda vida, pelo carinho, incentivo e inestimável ajuda durante toda essa jornada.

À Mari, Rafa e Paty pela amizade, ajuda, aconselhamentos e por me proporcionarem agradáveis momentos de diversão.

Ao Lucas pelo auxílio prestado no decorrer dos experimentos.

A todos os amigos e professores do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que de diferentes formas compartilharam comigo seus conhecimentos, possibilitando a realização desse trabalho.

Aos meus pais e irmão, sempre amorosos, por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos.

Ao Júlio pelo companheirismo, paciência, amor e por estar sempre presente em minha vida, me ajudando a superar os momentos difíceis.

Aos amigos de Viçosa por terem feito parte dos melhores anos da minha vida.

À minha amiga Sabrina pelo carinho, sugestões e sempre me dar uma força nos momentos de aperto.

A todos os meus amigos e parentes por sempre me incentivarem, apoiarem e torcerem por mim.

À VALE, Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade concedida.

A Deus por ter me acompanhado ao longo dessa caminhada, me dando forças para encarar e vencer todos os desafios.

RESUMO

Há uma grande preocupação atualmente com a contaminação de corpos d'água por efluentes industriais, com destaque para os oleosos. O tratamento biológico desses efluentes e demais áreas contaminadas com derivados de petróleo vem ganhando destaque, sobretudo por sua simplicidade, baixo custo e menor impacto ambiental. Adicionalmente, esses efluentes podem apresentar grande diversidade de micro-organismos com adaptações de interesse para aplicação em processos industriais, o que reforça a importância da prospecção microbiana desse material. Micro-organismos com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo e/ou produção de Compostos Ativos de Superfície (CAS) e enzimas hidrolíticas/oxidativas foram isolados a partir de efluentes oleosos de uma lagoa aerada facultativa de uma estação de tratamento de efluentes industriais (ETEI). Os efluentes oleosos foram caracterizados quanto à população bacteriana total e degradadora de compostos hidrofóbicos (óleo lubrificante, parafina, querosene) e quanto à diversidade metabólica frente a 31 fontes de carbono utilizando o sistema Biolog-ECOPLATE. A população heterotrófica total foi de $3,36 \times 10^7$ NMP mL⁻¹ e a de bactérias degradadoras de óleo lubrificante, parafina e querosene correspondeu a 0,49%, 0,017% e 0,036% desse total, respectivamente. A diversidade metabólica da comunidade foi alta, com consumo de 30 fontes de carbono de forma expressiva nas primeiras 48 horas. Foi isolado um total de 112 bactérias com e sem a utilização da técnica de enriquecimento em meio mineral suplementado com hidrocarbonetos. 82 desses isolados foram identificados a partir de sequenciamento de regiões do gene do rRNA 16S. Os gêneros observados foram predominantemente *Bacillus* sp., sendo encontrados também *Rhodococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Leucobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Acinetobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp., *Alcaligenes* sp., *Enterococcus* sp. e *Kerstersia* sp. e a frequência relativa dos mesmos foi variável de acordo com o método de seleção. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de crescer e produzir CAS em meio mineral contendo óleo bruto e glicose. A glicose promoveu as maiores médias de crescimento (expressas em DO₆₀₀ e biomassa seca em mg mL⁻¹), mas aproximadamente 10% dos isolados também foram capazes de apresentar alto crescimento no meio adicionado

de óleo ($DO_{600} > 1,5$). A fonte que proporcionou as maiores médias de atividade surfactante/emulsificante foi a glicose e 24% dos isolados apresentaram atividade emulsificante somente com a utilização dessa fonte, 12% somente com a utilização do óleo e 64% com a utilização de ambas as fontes. O índice de emulsificação variou de 0 a 76%, sendo que os maiores índices, acima de 60,00%, foram obtidos por 15 isolados com a utilização de glicose (13,4%) e 12 (10,7%) com o óleo. A atividade surfactante dos isolados, avaliada pelo espalhamento da gota, variou de 0 a 2,2, cm e 3 isolados (2,7%) promoveram os melhores resultados, com espalhamento acima de 1,8 cm. A atividade surfactante, avaliada pela redução da tensão superficial, variou de 68 mN m^{-1} a 29.9 mN m^{-1} , sendo que 4 isolados (3,9%) apresentaram os melhores resultados, com redução da tensão para valores menores que $35,0 \text{ mN m}^{-1}$. Na avaliação de 70 isolados quanto ao potencial de degradar hidrocarbonetos, foi possível confirmar a presença da atividade da enzima catecol 1,2-dioxigenase em 8 isolados e de alcano hidroxilases dos grupos II e III em 10 e 14 isolados, respectivamente. Também a presença de atividade de esterases, lipases, epóxido-hidrolases terminais, epóxido hidrolases não terminais, Baeyer-Viliger monooxigenases dos grupos 1 e 3 foram detectadas em 5, 16, 6, 7, 5, e 12 isolados, respectivamente. Os isolados *Bacillus subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp.* LAPER 94 produziram $1,85 \text{ g L}^{-1}$, $0,95 \text{ g L}^{-1}$ e $1,1 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente dos CAS, quando crescidos em meio mineral adicionado de 2% (g/v) de glicose. Os extratos brutos, obtidos por meio da precipitação com etanol formaram emulsões estáveis com hidrocarbonetos alifáticos (hexano e hexadecano), aromáticos (tolueno e xileno) e produtos do petróleo (querosene, óleo lubrificante, óleo diesel). Essas biomoléculas apresentaram em sua composição percentuais variáveis de proteínas (3,08 a 38,52%), carboidratos (8,79 a 50,40%) e lipídeos (16 a 40%). Outro aspecto avaliado foi a capacidade de degradação de hidrocarbonetos e remoção de óleo bruto durante o cultivo em meio mineral suplementado com esse substrato. De 10 isolados avaliados, seis apresentaram taxas de remoção de óleo entre 37% e 90%, sendo a maior taxa observada para *Acinetobacter junni* LAPM 30.

ABSTRACT

Nowadays, there is a great concern regarding the waterbodies contamination by industrial wastewaters, especially the oily ones. The biological treatment of these wastewaters and other oil contaminated areas is increasingly being distinguished mainly because of its simplicity, low costs and lower environmental impacts. Furthermore, these wastewaters can present a large microbial diversity exhibiting interesting adaptations for applications in industrial processes, which reinforces the importance of microbial prospecting of this material. Microorganisms with the potential for oil hydrocarbons degradation and/or for production of Surface Active Compounds (SAC) and hydrolitic/oxidative enzymes were isolated from oily wastewaters from a facultative lagoon located on a industrial wastewaters treatment plant. The oily wastewaters were characterized regarding their total bacterial population and the hydrophobic compounds degrading ones (motor oil, paraffin and kerosene) and regarding the metabolic diversity against 31 carbon sources using the Biolog-ECOPLATE system. The total heterotrophic population was $3,36 \times 10^7$ NMP mL⁻¹ and the degrading bacteria one for motor oil, paraffin and kerosene corresponded to 0,49%, 0,017% e 0,036% of this total, respectively. The metabolic diversity in the community was high, consuming 30 carbon sources expressively in the first 48 hours. A total of 112 bacteria were isolated with and without using the enrichment technique in mineral broth supplemented with hydrocarbons. 82 of these isolates were identified sequencing regions of the 16S rRNA gene. The prevailing observed genus was *Bacillus sp.*, being also found *Rhodococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Leucobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Shewanella sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Enterococcus sp.* and *Kerstersia sp.* and the relative frequency of them varied according to the selection method. The isolates were evaluated regarding their capacity to grow and produce SAC in mineral broth containing crude oil and glucose. The glucose essays obtained the highest growth means (expressed in optical density at 600 nm and dried biomass in mg mL⁻¹), but nearly 10% of the isolates was also able to perform a high growth in the medium supplemented with oil (O.D. 600 nm > 1.5). The source which provided the highest means of surfactant/emulsifying activity was glucose and 24% of the isolates presented emulsifying activity only using this

source, 12% only using oil and 64% using both sources. The emulsifying index varied from 0 to 76%, being the highest indexes, above 60%, obtained from 15 isolates using glucose (13,4%) and 12 (10,7%) using oil. The surfactant activity of the isolates, evaluated by the drop spreading, varied from 0 to 2.2 cm and 3 isolates (2,7%) promoted the best results, with a spreading above 1.8 cm. The surfactant activity, evaluated by the surface tension decay, varied from 68 mN m⁻¹ to 29.9 mN m⁻¹, and 4 of the isolates (3,9%) promoted the best results, reducing the tension to values below 35,0 mN m⁻¹. In the evaluation of 70 isolates regarding the potential to degrade hydrocarbons, it was possible to confirm the catechol 1,2-dioxygenase enzyme activity in 8 isolates and of groups II and III alkane hydroxylases in 10 and 14 isolates, respectively. The activity of esterases, lipases, terminal epoxide hydrolases, non-terminal epoxide hydrolases and groups 1 and 3 Baeyer-Viliger monooxygenases were detected in 5, 16, 6, 7, 5 and 12 isolates, respectively. The isolates *Bacillus subtilis* LAPER 90 and LAPER 93 and *Alcaligenes sp.* LAPER 94 produced respectively 1.85 g L⁻¹, 0.95 g L⁻¹ e 1.1 g L⁻¹ of the SAC when grown in mineral broth supplemented with 2% (g/v) of glucose. The crude extracts, obtained through the precipitation with ethanol, formed stable emulsions with aliphatic hydrocarbons (hexane and hexadecane), aromatics (toluene and xylene) and oil products (kerosene, motor oil and Diesel fuel). These biomolecules presented in their composition variable percentages of proteins (3.08 to 38.52%), carbohydrates (8.79 to 50.40%) and lipids (16 to 40%). Another feature evaluated was the capacity to degrade hydrocarbons and remove crude oil during the cultivation in mineral broth supplemented with this substratum. From 10 evaluated isolates, 6 presented oil removal rates between 37 and 90%, being the highest one observed for *Acinetobacter junni* LAPM 30.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Adição de oxigênio à compostos alifáticos por monooxigenases (Fritsche & Hofrichter, 2000)..... | 31 |
| Figura 2: Vias de degradação aeróbia de alcanos, por oxidação terminal e subterminal. AH: alcano hidroxilase; AD: álcool desidrogenase; ALD: Aldeído desidrogenase; ACS: Acetil-CoA sintetase; ω -H: ω -hidroxilase; BMV: Baeyer-Villiger monooxigenase; E: Esterase; TCA: ácido tricarbóxico (Adaptada de ROJO, 2009). | 32 |
| Figura 3: Conversão de compostos aromáticos oxidados ao A) catecol e B) protocatecoato, alguns dos intermediários centrais da via aeróbia de degradação desses compostos (adaptado de FRITSCHÉ & HOFRICHTER 2000)..... | 34 |
| Figura 4: Vias de orto e meta clivagem de degradação aeróbia de compostos aromáticos (adaptado de FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2000)..... | 35 |
| Figura 5. Modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona para a triagem de hidrolases e monooxigenases..... | 42 |
| Figura 6: Densidade da população de bactérias heterotróficas totais e da população bacteriana degradadora dos hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, querosene e parafina, determinadas pela técnica de NMP. Barras indicam os valores de desvio padrão. As médias com letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. | 62 |
| Figura 7: Média da Densidade ótica a 590 nm dos grupos de compostos carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, amins/amidas, aminoácidos e ácidos acéticos carboxílicos em função do tempo de avaliação expressos em horas..... | 64 |
| Figura 8: Frequência relativa (%) dos gêneros obtidos em cada um dos três métodos de isolamento. (A) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo plaqueamento direto. (B) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo plaqueamento de alíquotas das microplacas utilizadas nos ensaios de cálculo do NMP mL ⁻¹ de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. (C) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo enriquecimento. | 73 |
| Figura 9: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase expressa em unidades de atividade enzimática (U) por mL de extrato celular, para os isolados nos quais a via de orto clivagem foi detectada..... | 90 |
| Figura 10: Amplificações do gene responsável pela codificação da enzima catecol 1,2 dioxigenase utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 50, 62 E 111 os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes. | 91 |

Figura 11: Amplificações dos genes responsáveis pela codificação das enzimas alceno hidroxilases (grupo II), utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 27, 30, 41, 42, 43, 46, 48, 61, 62 e 63, os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes.....95

Figura 12: Amplificações dos genes responsáveis pela codificação das enzimas alceno hidroxilases (grupo III), utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 27, 30, 41, 50, 55, 59, 61, 62 e 66, 102, 103, 104 e 105 os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes.95

Figura 13: Número de isolados que apresentaram conversões enzimáticas significativas (acima de 5%) para cada uma das sondas fluorogênicas testadas. ES1-sonda para esterase; LIP- sonda para lipase; EP1-sonda para epóxidos terminais; EP2- sonda para epóxidos não terminais; BV1 e BV3- Sondas para difetentes Baeyer-Villiger monoxigenases99

Figura 14: Atividade emulsificante dos compostos tensoativos produzidos pelos isolados (A) *B. subtilis* LAPER 90; (B) *B. subtilis* LAPER 93; (C) *Alcaligenes* sp. LAPER 94 na concentração de 5 mg mL⁻¹, utilizando diferentes compostos hidrofóbicos. Atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E24). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nos três gráficos e pelas mesmas letras minúsculas individualmente em cada gráfico foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey com nível mínimo de significância de 0,05.....108

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Hidrocarbonetos nas frações de petróleo (Adaptado de BAKER & HERSON, 1994)..... | 27 |
| Tabela 2: Valor do coeficiente angular e de R ² (coeficiente de determinação) das equações das retas obtidas pelas plotagens dos valores de densidade ótica a 590 nm de cada um dos grupos de compostos em função do tempo | 64 |
| Tabela 3: Identificação dos isolados por meio da compração de sequências obtidas da região 16S com sequências depositadas no GenBank | 70 |
| Tabela 4. Valores de atividade emulsificante (E24) agrupados em cinco classes..... | 81 |
| Tabela 5. Valores de atividade surfactante (espalhamento da gota) agrupados em cinco classes..... | 88 |
| Tabela 6. Valores finais de atividade surfactante (redução da tensão superficial do sobrenadante) agrupados em cinco classes..... | 86 |
| Tabela 7: Conversões enzimáticas (%) das reações catalisadas pelo isolados selecionados utilizando sondas fluorogênicas para detecção das enzimas esterases, lipases, epóxido hidrolases e Baeyer-Villiger monooxigenases..... | 100 |
| Tabela 8: Caracterização parcial dos CAS produzidos por três isolados selecionados, quanto à composição de carboidratos totais, proteínas e lipídeos..... | 106 |
| Tabela 9: Remoção de óleo proporcionada pelo isolados (%)..... | 109 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1: Fontes de carbono presentes no sistema Biolog-ECOPLATE..... | 142 |
| Anexo 2: Tabela 3: Descrição morfológica das colônias, morfologia celular, reação tintorial de gram e densidade dos isolados obtidos do efluente oleoso por meio do plaqueamento direto, plaqueamento de alíquotas das microplacas e pelo método de enriquecimento..... | 143 |
| Anexo 3: Crescimento (D.O 600nm e biomassa seca), índice de emulsificação, e atividade surfactante (espalhamento da gota e leitura da tensão superficial), dos isolados após o cultivo em meio MMB adicionado de óleo bruto ou glicose..... | 147 |
| Anexo 4: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados, avaliado pelo parâmetro Densidade ótica a 600 nm, nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto..... | 155 |
| Anexo 5: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados, avaliado pelo parâmetro biomassa seca (mg/mL), nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto..... | 155 |
| Anexo 6: Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante (E24) dos isolados nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto..... | 155 |
| Anexo 7: Análise de variância (ANOVA) para a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro espalhamento da gota nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto..... | 156 |
| Anexo 8: Análise de variância (ANOVA) para a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro redução de tensão superficial nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto..... | 156 |
| Anexo 9: Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante (E24) dos cas selecionados nos compostos hidrofóbicos: Querosene, Tolueno, Xileno, Hexano, Hexadecano, óleo lubrificante, óleo diesel, óleo recuperado e óleo bruto | 156 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ETEI - Estação de Tratamento de efluentes industriais
NMP - Número mais Provável
MMB - Meio Mineral para Bactérias
BHI - Brain heart infusion
µL - microlitro
% - por cento
CAS - Compostos Ativos de Superfície
AS- atividade surfactante
cm - centímetro
nm - nanômetro
DO - densidade ótica
DO₆₀₀ - densidade ótica a 600 nm
UFC- Unidades formadoras de colônias
E24 - índice de emulsificação mensurado após 24 h
C - carbono
rpm- Rotações por minuto
g - gravidade
g L⁻¹ - grama por litro
h - hora
min - minuto
seg - segundo
mg - miligrama
mg mL⁻¹ - miligrama por mililitro
mL - mililitro
mm - milímetro
mmol - milimol
°C - grau Celsius
pH - potencial hidrogeniônico
v/v - volume por volume
g/v- grama por volume
pmol - picomol
mN m⁻¹- mili Newtons por metro
U - Unidade
Tris-HCl - Tris hidrocloreto
p - p valor

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.) INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 18 |
| 2.) REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| 2.1) Efluentes industriais e a contaminação das águas..... | 20 |
| 2.1.1) Efluentes oleosos..... | 21 |
| 2.2) Utilização de micro-organismos no tratamento de efluentes oleosos e áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo..... | 24 |
| 2.3) Biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo..... | 26 |
| 2.3.1) Vias de degradação..... | 31 |
| 2.3.1.1) Degradação de compostos alifáticos..... | 31 |
| 2.3.1.2) Degradação de compostos aromáticos..... | 33 |
| 2.4) Prospecção de produtos microbianos de bactérias de efluentes industriais..... | 35 |
| 2.4.1) Produção de compostos ativos de superfície (CAS)..... | 37 |
| 2.4.2) Produção de enzimas..... | 40 |
| 3.) OBJETIVOS..... | 44 |
| 3.1) Geral..... | 44 |
| 3.2) Específicos..... | 44 |
| 4.) MATERIAL E MÉTODOS..... | 46 |
| 4.1) Amostragem..... | 46 |
| 4.2) Isolamento e determinação da densidade de bactérias presentes no efluente oleoso..... | 46 |
| 4.2.1) Isolamento e quantificação de bactérias morfológicamente distintas presentes nos efluentes oleosos | 46 |
| 4.2.2) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene..... | 47 |
| 4.3) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana total das amostras..... | 48 |
| 4.4) Isolamento de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos pelo método de enriquecimento..... | 49 |
| 4.5) Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares..... | 49 |
| 4.5.1) Extração de DNA..... | 50 |
| 4.5.2) Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de regiões do gene do rRNA 16S..... | 50 |
| 4.5.3) Purificação dos amplicons..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 4.5.4) Reação de Sequenciamento | 51 |
| 4.5.5) Frequência relativa dos gêneros observados..... | 52 |
| 4.6) Avaliação do crescimento e produção de Compostos Ativos de Superfície em meio mineral adicionado de glicose e óleo bruto..... | 52 |
| 4.6.1) Avaliação da atividade surfactante pela medida da tensão superficial..... | 53 |
| 4.6.2) Medida da atividade surfactante pelo teste do espalhamento da gota..... | 53 |
| 4.6.3) Método da atividade emulsificante..... | 53 |
| 4.7) Avaliação da produção das enzimas degradativas de hidrocarbonetos: catecol dioxigenases e alcano hidroxilases..... | 54 |
| 4.7.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol por testes colorimétricos..... | 54 |
| 4.7.2) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol pela detecção dos genes responsáveis pela codificação das enzimas..... | 55 |
| 4.7.3) Determinação da produção de enzimas alcano hidroxilases..... | 56 |
| 4.8) Avaliação da produção das enzimas esterases, lipases, hipóxido hidrolases e monooxigenases pela técnica de triagem de alto desempenho (HTS)..... | 57 |
| 4.9) Produção e caracterização dos Compostos Ativos de Superfície produzidos pelas bactérias selecionadas..... | 58 |
| 4.9.1) Extração alcoólica dos Compostos Ativos de Superfície..... | 58 |
| 4.9.2) Caracterização parcial da composição química dos Compostos Ativos de Superfície..... | 59 |
| 4.9.3) Determinação da capacidade de formar emulsões estáveis em diferentes fases orgânicas..... | 59 |
| 4.10) Avaliação da biodegradação do óleo bruto em sistema de batelada..... | 59 |
| 4.11) Análises estatísticas..... | 60 |
| 5.) RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 61 |
| 5.1) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene..... | 61 |
| 5.2) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana cultivável total das amostras utilizando o sistema Biolog-ECOPLATE. | 63 |
| 5.3) Isolados bacterianos cultiváveis obtidos por meio do plaqueamento direto do efluente oleoso, plaqueamento de alíquotas das microplacas e pelo método de enriquecimento..... | 66 |

| | |
|--|-----|
| 5.4) Identificação dos isolados bacterianos..... | 69 |
| 5.5) Crescimento, atividade surfactante e emulsificante dos isolados bacterianos..... | 76 |
| 5.5.1) Crescimento dos isolados bacterianos em glicose e óleo bruto..... | 76 |
| 5.5.2) Atividade emulsificante (E ₂₄) dos isolados bacterianos..... | 77 |
| 5.5.3) Atividade surfactante dos isolados bacterianos..... | 82 |
| 5.6) Produção de enzimas degradativas de hidrocarbonetos..... | 89 |
| 5.6.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol..... | 90 |
| 5.6.1.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol por testes colorimétricos e pela determinação da presença dos genes responsáveis pela codificação dessas enzimas..... | 90 |
| 5.6.2) Determinação da produção de enzimas alceno-hidroxilases..... | 94 |
| 5.7) Avaliação da produção das enzimas esterases, lipases, hipóxido hidrolases e monooxigenases pela técnica de triagem de alto desempenho (HTS)..... | 98 |
| 5.8) Produção e caracterização parcial dos Compostos Ativos de Superfície produzidos pelas bactérias..... | 103 |
| 5.8.1) Extração alcoólica dos Compostos Ativos de Superfície..... | 104 |
| 5.8.2) Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes..... | 104 |
| 5.8.3) Determinação da atividade emulsificante em diferentes substratos hidrofóbicos..... | 106 |
| 5.9) Avaliação da biodegradação do efluente oleoso em meio líquido..... | 109 |
| 6.) CONCLUSÕES | 112 |
| 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| ANEXO..... | |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As atividades industriais são extremamente importantes para o desenvolvimento da sociedade, pois são responsáveis pela geração de bens de consumo indispensáveis aos padrões de vida atuais. Entretanto, essas atividades geram uma grande quantidade de efluentes líquidos e resíduos sólidos. Se esses resíduos forem descartados incorretamente em corpos d'água, serão responsáveis por comprometer a qualidade e equilíbrio do meio ambiente, devendo ser prejudiciais às plantas e a saúde animal e humana. Isso tem levado a um aumento da cobrança de órgãos ambientais e da sociedade, em geral, para que ocorra a disposição e tratamento adequado dos resíduos.

Dentre os efluentes gerados pelos processos industriais, os oleosos recebem destaque por conter uma vasta gama de hidrocarbonetos provenientes de derivados do petróleo como óleo bruto, óleo lubrificante, óleo diesel, dentre outros. Dentre as alternativas viáveis para o tratamento desses efluentes e demais ambientes contaminados com derivados de petróleo, destaca-se o tratamento biológico, que se baseia na utilização de micro-organismos com capacidade de degradar o contaminante ou transformá-lo em formas menos tóxicas. Isso, porque apesar dos tratamentos mais comumente utilizados serem baseados em métodos físicos e químicos, os tratamentos biológicos apresentam diversas vantagens, como baixo custo, baixo impacto ao meio ambiente e a possibilidade de uma eliminação total do contaminante.

Muito comumente, micro-organismos com capacidade de degradar os hidrocarbonetos de petróleo são isolados de ambientes contaminados com esses compostos, como os próprios efluentes oleosos, pelo fato de possuírem várias rotas metabólicas que lhes permite sobreviver e utilizar os compostos ali presentes como fontes de carbono e energia. Isso fundamenta a realização de estudos de prospecção de micro-organismos com potencial degradativo nesses sítios.

Adicionalmente, produtos produzidos por esses micro-organismos para sobreviver nesses ambientes extremos e utilizar os hidrocarbonetos de petróleo também são de interesse e sua prospecção é importante, pois os mesmos maximizam uma série de processos industriais, gerando um alto faturamento para esse setor. Dentre eles destacam-se os Compostos Ativos de Superfície (CAS) e as enzimas. Os Compostos

Ativos de Superfície são produzidos pelos micro-organismos para promover o aumento da área superficial de substratos de crescimento insolúveis em água e o aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, aumentando a sua solubilidade aparente ou promovendo sua dessorção de superfície, ou para regular a adesão e desprendimento dos micro-organismos de diferentes superfícies bióticas ou abióticas.

Os CAS microbianos apresentam importantes vantagens de utilização quando comparado aos sintéticos, incluindo a menor toxicidade, biodegradabilidade e estabilidade em faixas amplas de pH e temperatura e na presença de eletrólitos, tornando-os adequados para a exploração em muitas aplicações industriais e ambientais e substitutos para os sintéticos. As potenciais aplicações comerciais dos CAS microbianos incluem biorremediação de ambientes contaminados com óleo, recuperação melhorada de petróleo, substituto de solventes clorados utilizados para a limpeza de tubos e máquinas contaminadas com óleo, recuperação de metais e minerais, utilização na indústria de detergentes, formulação de herbicidas e pesticidas e na formação de emulsões estáveis óleo em água nas indústrias alimentar e cosméticas.

As enzimas, por sua vez, são uma importante classe de produtos microbianos, utilizadas por eles para os mais diferentes fins, inclusive para a oxidação de contaminantes. Elas são biocatalisadoras naturais preferencialmente usadas para acelerar diferentes processos industriais, porque são mais estáveis, possuem uma grande diversidade catalítica e ainda possibilidade de manipulação genética.

Nesse contexto, a realização desse trabalho trará muitas contribuições nessa área, pois permitirá um maior conhecimento da diversidade bacteriana de efluentes oleosos, a possibilidade de obtenção de bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, e que possam ser utilizadas para o tratamento dos próprios efluentes, além de uma série de Compostos Ativos de Superfície e enzimas de interesse industrial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Efluentes industriais e a contaminação das águas

Toda e qualquer forma de exploração e uso dos recursos naturais e dos produtos de sua transformação, por mais cuidadosa que seja, provoca poluição e degradação ambiental. Como a sobrevivência humana depende da exploração desses recursos, torna-se necessário conhecer os efeitos de sua exploração, não para impedir a poluição, o que é impossível, mas para se tomar consciência das formas de exploração que conduzam à minimização de impactos ambientais (STRUJACK & VIDAL, 2007).

Com a evolução dos processos industriais e conseqüente surgimento de inúmeros produtos, que rapidamente tornaram-se de primeira necessidade, a atividade industrial adquiriu um caráter essencial na sociedade contemporânea (CASTRO, 2009). O Brasil possui um grandioso parque industrial que constitui um fator importante na economia brasileira, mas por outro lado é responsável por gerar um grande volume de efluentes e resíduos sólidos, que podem causar problemas de contaminação se não forem corretamente tratados e dispostos (HASSEMER & SENS, 2002; KUNZ *et al.*, 2002).

Nas indústrias, as águas são um elemento fundamental e podem ser utilizadas de diversas formas, tais como: incorporação aos produtos; limpezas de pisos, tubulações e equipamentos; resfriamento; aspersão sobre pilhas de minérios, para evitar o arraste de finos e sobre áreas de tráfego para evitar poeiras; irrigação; lavagem de veículos; oficinas de manutenção; consumo humano e usos sanitários (BAGAJEWICZ, 2000; GIORDANO, 2004). Dentro desse contexto, uma importante parcela do processo de contaminação pode ser atribuída às atividades das refinarias de petróleo, indústrias químicas, têxteis, papelarias e de mineração (FREIRE *et al.*, 2000).

Dentre os efluentes industriais mais comumente gerados, destaca-se os oleosos, que representam um percentual elevado nos problemas associados a poluentes orgânicos, uma vez que os combustíveis fósseis, como o petróleo e seus subprodutos, são fonte de matéria prima e geração de energia da maioria de processos industriais da atualidade (ROSA, 2003).

Assim, embora a importância da atividade industrial seja indiscutível, a mesma costuma ser responsabilizada tanto pelo excesso de consumo, quanto pela contaminação ambiental e um dos seus maiores desafios é conviver pacificamente com o meio ambiente em tempos de escassez de recursos hídricos (AL-READHWAN *et al.*, 2005; CASTRO, 2009). Isso tem levado a um aumento no rigor da legislação, no que se refere ao descarte desse efluente e da pressão da sociedade por políticas ambientais responsáveis, o que tem feito com que as grandes empresas adotem novos projetos para minimizar o uso das águas, promover sua reutilização e o tratamento adequado da grande quantidade de efluentes gerados para posterior descarte nos corpos d'água (AL-READHWAN *et al.*, 2005; SCHULZ, 2005).

2.1.1) Efluentes oleosos

Os efluentes oleosos são gerados como resultado do contato direto da água com produtos oleosos, como óleos lubrificantes, graxas, óleo diesel e outros de origem animal, vegetal e sintética (GONZALES & TOREM, 2010). Esses efluentes são caracterizados por apresentarem composição bastante complexa, podendo conter além dos óleos, ácidos graxos, emulsificantes, inibidores de corrosão, bactericidas e outros compostos químicos (GRYTA *et al.*, 2001).

O petróleo bruto, liberado das indústrias petroquímicas e o óleo lubrificante e de corte, normalmente liberados de indústrias de processamento de metais e lavagem de carros constituem os principais poluentes das águas residuárias oleosas (ALLARD & NEILSON, 1997; QING *et al.*, 2005; TELLEZ *et al.*, 2002). Os efluentes de empresas de transportes públicos, com manutenção de mecânica pesada, também têm características impactantes comparáveis as de efluentes industriais (MACHADO *et al.*, 2005).

Nesses efluentes o óleo pode estar presente na forma livre, dispersa, emulsificada ou solubilizada, de acordo com o tamanho das partículas oleosas. O óleo livre é formado por gotas com diâmetro superior a 150 μm , o óleo disperso por gotas entre 50 e 100 μm , o óleo emulsificado por gotas abaixo de 50 μm e o dissolvido por gotículas ainda menores (CHERYAN & RAJAGOPALAN, 1998).

Uma emulsão é definida como a mistura de dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, onde uma das fases encontra-se dispersa na outra sob a forma de gotas de tamanho microscópico ou coloidal. Existem duas formas básicas de

emulsão, emulsão óleo em água, onde gotas de óleo estão dispersas na água e emulsão água em óleo, onde gotas de água estão dispersas no óleo (CHEN & TAO, 2005), sendo que grande parte dos efluentes oleosos apresenta-se na forma de emulsões óleo em água (GRYTA *et al.*, 2001).

Os efluentes oleosos podem afetar a qualidade das águas tanto profundas quanto superficiais; e esta contaminação é muito preocupante porque, como discutido anteriormente, esses efluentes contêm substâncias tóxicas, como fenóis e hidrocarbonetos poliaromáticos, que são inibitórios ao crescimento das plantas e mutagênicos aos animais e seres humanos (TRI, 2002; PENDASHTEH *et al.*, 2010). Estes compostos concentrados na água são especialmente nocivos à vida aquática, porque diminuem a penetração de luz e perturbam o mecanismo de transferência de oxigênio, eliminando a fauna e flora da superfície das águas contaminadas (SRIJAROONRAT *et al.*, 1999).

Por isso nos últimos anos, considerável atenção tem sido dada para a descarga de efluentes oleosos e seu impacto no meio ambiente. Consequentemente, remover óleos, em geral, de efluentes é um importante aspecto no controle de poluição de várias indústrias (SRIJAROONRAT *et al.*, 1999). A concentração máxima permitida de óleo e sólidos nos efluentes depende da legislação de cada país. No Brasil, a Resolução do CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005 determina, em seu capítulo IV, artigo 34 e inciso 4, que o padrão de lançamento de efluentes em corpos d'água para óleos minerais é de até 20 mg L⁻¹ e para óleos vegetais e gorduras animais é de até 50 mg L⁻¹ (CONAMA, 2005).

Após o tratamento, há a possibilidade de reuso da água para uma série de operações (BAGAJEWICZ, 2000). Existem muitas opções de técnicas para o tratamento de efluentes e os procedimentos escolhidos serão determinados pelo tipo de efluente e concentração dos contaminantes (BAGAJEWICZ, 2000). De modo geral, sistemas de tratamento de efluentes são baseados na transformação dos poluentes dissolvidos e em suspensão em gases inertes e/ou sólidos sedimentáveis para posterior separação das fases sólida/líquida. Sendo assim, se não houver a formação de gases inertes ou lodo estável, não podemos considerar que o tratamento foi eficiente, sendo observado ainda nos efluentes valores altos de sólidos solúveis suspensos (SST), voláteis (SSV), demanda biológica de oxigênio (DBO) ou demanda

química de oxigênio (DQO), indicadores indiretos da presença de matéria orgânica (GIORDANNO, 2004).

O óleo livre é removido com relativa facilidade, sendo sua separação um processo exclusivamente físico e realizado por meio de técnicas como separação por gravidade, filtração, adsorção, extração, dentre outras (CAPPS *et al.*, 1993; SRIJAROONRAT *et al.*, 1999). Entretanto, no caso do óleo emulsificado, o diâmetro pequeno das gotas dificulta a sua separação por meios convencionais (HU *et al.*, 2002). Geralmente, o tratamento de óleo emulsificado requer a utilização de tratamentos químicos, térmicos, ou ambos, para a desestabilização das partículas. Os métodos de desestabilização térmica envolvem o aquecimento do efluente, para reduzir sua viscosidade, acentuar a diferença de densidade e enfraquecer o filme interfacial estável da fase óleo (CHERYAN & RAJAGOPALAN, 1998). Já a desestabilização química envolve a adição de agentes coagulantes no efluente, promovendo a quebra da emulsão, o que ocorre devido à redução da carga superficial das gotas, causando coalescência das gotículas de óleo e subsequente separação da fase aquosa da fase oleosa por sedimentação convencional ou flotação por ar dissolvido (CANIZARES *et al.*, 2007).

A quebra de emulsão também pode ser realizada utilizando-se micro-organismos. Estudos têm demonstrado a capacidade de algumas espécies microbianas de modificar as propriedades das emulsões, desestabilizando-as, seja por meio de suas superfícies celulares hidrofóbicas, pela produção de compostos ativos de superfície, pela capacidade de degradação ou transformação dos componentes oleosos emulsionados ou pela modificação do pH na interface da emulsão (CAIRNS *et al.*, 1982; KOSARIC *et al.*, 1987; BANAT, 1995; NADARAJAH *et al.*, 2002). Alguns gêneros de micro-organismos comumente relatados como bons de-emulsificantes são *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Arthrobacter* (KOSARIC *et al.*, 1987). A remoção do óleo solubilizado também é extremamente difícil, requerendo o uso de processos químicos especiais tais como, a extração com solventes, e/ou o emprego do tratamento biológico (ROSA, 2003).

2.2) Utilização de micro-organismos no tratamento de efluentes oleosos e áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo

Como mencionado anteriormente, efluentes oleosos podem ser tratados por meio de métodos químicos, físicos ou biológicos. Entretanto, os métodos físicos e químicos, podem ser ineficazes e inadequados, fazendo-se necessário, nessas situações, a utilização de tratamentos biológicos, que vem sendo cada vez mais utilizados na maioria das indústrias, principalmente para a remoção de matéria orgânica e demais componentes solúveis presentes nesses efluentes (FREIRE *et al.*, 2000; ADESODUN & MABAGWU, 2008). Isso também é válido para solos, águas subterrâneas e demais áreas contaminadas com derivados de petróleo, para os quais tratamentos físicos-químicos são muito caros e podem alterar a composição química natural do ambiente, causando desequilíbrios (DAVIS *et al.*, 2003; WHANG *et al.*, 2008).

O tratamento biológico envolve a utilização de seres vivos para acelerar a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de ambientes contaminados, seja via mineralização, conversão dos mesmos em formas menos tóxicas, por degradação ou inativação, ou por adsorção, sendo o processo denominado biorremediação (CUNHA & LEITE, 2000). A biorremediação é um tratamento que pode apresentar um melhor custo-benefício, simplicidade e baixo impacto ambiental, se comparado às técnicas físico-químicas (LOVLEY, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Mas a maior vantagem se deve ao fato de poder conduzir à total mineralização dos contaminantes, inclusive daqueles considerados recalcitrantes (BAKER & HERSON, 1994; ANDRADE *et al.*, 2010). Processos físico-químicos, na maioria das vezes, promovem somente a concentração dos mesmos e não sua degradação efetiva, persistindo o problema do ponto de vista ambiental (FREIRE, 2000).

O sistema biológico mais comumente empregado para o tratamento de efluentes industriais é o de lodos ativados, no qual uma população microbiana diversificada age na degradação dos compostos orgânicos naturais ou sintéticos e bio-transformação ou adsorção dos inorgânicos (VON SPERLING, 1997; GONZALES *et al.*, 2001). Esse sistema consiste basicamente de um tanque de aeração, onde o efluente é aerado e homogeneizado na presença dos micro-organismos, para que ocorra a oxidação e degradação da matéria orgânica presente (GONZALES *et al.*, 2001; PEREIRA & FREIRE, 2005). O sistema é dotado ainda de um tanque de sedimentação, no qual

são sedimentados os flocos microbianos produzidos durante a fase de oxidação no tanque de aeração (FREIRE *et al.*, 2000). Uma característica adicional do sistema de lodos ativados é a recirculação de grande proporção da biomassa, fazendo com que boa parte dos micro-organismos permaneça por um longo tempo de residência no meio, o que facilita o processo de oxidação dos compostos orgânicos e reduz o tempo de retenção hidráulica do efluente (PEREIRA & FREIRE, 2005).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são agentes de biorremediação eficazes, devido a sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias, assimilando-as como fontes de carbono e/ou de energia (URURAHY, 1998). Devido a esse aspecto, cresce o estímulo a estudos de aplicação de micro-organismos no tratamento destes resíduos de forma que não altere a qualidade de vida da população, que está intrinsecamente ligada à qualidade ambiental (VANCE-HARROP *et al.*, 2004; URUM *et al.*, 2004) e elesvem sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (URURAHY, 1998).

Hamed e colaboradores (2010) avaliaram a eficiência de degradação de efluentes oleosos e sanitários de uma refinaria por meio de um sistema de lodos ativados. Os experimentos foram conduzidos em um reator aeróbio e, por resultados de cromatografia gasosa, observou-se uma biodegradabilidade de 97% dos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), após um período de 19 dias de operação do sistema.

Manafi e colaboradores (2011) avaliaram a biodegradabilidade de efluentes industriais com alta concentração de compostos fenólicos pelo isolado *Alcaligenes faecalis* PTCC 1624. Os experimentos foram conduzidos em um reator aeróbio e observou-se, após um período de tratamento de 72 h, uma biodegradação de 80% do fenol inicialmente presente.

A biorremediação depende da existência de micro-organismos com capacidade metabólica de degradar o contaminante, com mecanismos que aumentem a disponibilidade desses contaminantes ao ataque microbiano e que proporcionem tolerância aos mesmos, além da estrutura química do composto que será degradado (SINGH & WARD, 2004). O processo de biodegradação também pode ser acelerado se forem criadas condições químicas e ambientais, como valores de pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio, adequadas para o crescimento microbiano e

consequente degradação dos poluentes (SINGH & WARD, 2004; KRIIPALU *et al.*, 2007).

O processo pode ser favorecido por dois métodos principais, a bioaugmentação e a bioestimulação, que podem ser realizadas separadamente ou em conjunto, dependendo das condições do material que será biodegradado (SARKAR *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2010). A bioaugmentação envolve a introdução de micro-organismos que possuem a capacidade metabólica de degradar o contaminante (SARKAR *et al.*, 2005). Mas nem sempre é necessária, porque frequentemente, já há micro-organismos no próprio ambiente a ser descontaminado, que são eficazes na remediação da contaminação existente no local. Isto se deve ao fato que essas condições favorecem o crescimento e a adaptação natural de micro-organismos capazes de sobreviver na presença dos contaminantes (CASTRO, 2009).

A bioestimulação consiste na adequação de fatores como o potencial redox, temperatura, umidade e pH (MARIANO *et al.*, 2007), além da introdução de nutrientes minerais, com o objetivo de aumentar a população e atividade dos micro-organismos autóctones ou daqueles introduzidos a partir da bioaugmentação (PANKRANTZ, 2001). É bem estabelecido que a disponibilidade de nitrogênio e fósforo limita a degradação microbiana de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos e que a correção da relação carbono:nitrogênio:fósforo pela adição de fertilizantes químicos aumenta a biodegradação do óleo cru e dos hidrocarbonetos individuais nesse ambiente (LEAHI & COLWELL, 1990).

2.3) Biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo

O petróleo é formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos, além de pequenas quantidades de oxigênio, nitrogênio e enxofre (VAN HAMME *et al.*, 2003). Existem mais de 600 compostos de hidrocarbonetos identificados no petróleo (FETTER, 1993), mas essa composição varia de acordo com a fração (Tabela 1).

Os compostos alifáticos compreendem os alcanos, alcenos alcinos ou alcadienos (FERREIRA, 2008). Os alcanos são hidrocarbonetos saturados e, por sua vez, compreendem os n-alcanos, alcanos ramificados e cicloalcanos, sendo que os n-alcanos são os principais componentes do petróleo (RODRIGUES, 2002). Eles podem

constituir até 50% do petróleo bruto, dependendo da fonte, o que explica sua presença como contaminantes, mesmo que em baixas concentrações, no solo e água (ROJO, 2009). Os cicloalcanos ou alcanos cíclicos também são importantes componentes do petróleo e muitos possuem cadeias laterais alquilas (KOMA *et al.*, 2005).

Compostos aromáticos podem ser definidos como compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que contém um ou mais anéis aromáticos (FUCHS, 2008; SEO *et al.*, 2009). Os hidrocarbonetos aromáticos são representados pelos monoaromáticos, como os compostos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), e os poliaromáticos, comumente denominados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAP e que são formados por dois ou mais anéis de benzeno fundidos e/ou anéis pentacíclicos em arranjos lineares, angulares ou em cluster (SILVA, 2002; KASTNER, 2000).

Tabela 1: Hidrocarbonetos nas frações de petróleo (Adaptado de BAKER & HERSON, 1994).

| Produto (Fração) | Principais componentes |
|-----------------------------|--|
| Gasolina | Hidrocarbonetos de cadeia alifática ou ramificada, com 6 a 10 átomos de carbono. Presença de ciclanos e alquibenzenos |
| Querosene/óleo diesel nº 01 | Hidrocarbonetos com 11 a 12 átomos de carbono. N-alcanos são predominantes, presença de alcanos ramificados, cicloalcanos e aromáticos. Baixos níveis de Benzenos e poucos poliaromáticos. |
| Óleo diesel leve | Hidrocarbonetos com 12 a 18 átomos de carbono, sendo o percentual de n-alcanos maior que do querosene. Presença de ciclanos, oleofinas e oleofinas aromáticas mistas. |
| Óleo diesel pesado | Hidrocarbonetos com 18 a 25 átomos de carbono. |
| Lubrificantes | Hidrocarbonetos com 26 a 28 átomos de carbono. |

Os compostos BTEX possuem grande solubilidade em água e, portanto, têm alto potencial de atingir o lençol freático (PENNER, 2000). Esses compostos representam um risco à saúde humana porque são poderosos depressores do sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2009). Dentre eles, o benzeno é o mais tóxico e em exposições crônicas pode causar leucopenia, câncer, vertigens, tremores e afetar o sistema nervoso central (PENNER, 2000).

Os Hidrocarboretos Policíclicos Aromáticos (HPAs) têm recebido atenção especial por serem uma importante classe de poluentes orgânicos ambientais e representarem um perigo para a saúde pública e o ecossistema, devido à suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas e a propriedade de se acumularem ao longo da cadeia alimentar (BAUMARD *et al.*; 1998; TIBURTIUS *et al.*, 2004). As fontes mais comuns de HPAs são tanto naturais quanto antropogênicas. Dentre as fontes antropogênicas inclui-se a queima de combustíveis fósseis, óleos lubrificantes usados, derramamentos de petróleo e várias atividades industriais (HARITASH & KAUSHIK, 2009).

A maior parte dos componentes do petróleo é biodegradável e, portanto, a degradação dos hidrocarbonetos presente nesse material por populações naturais de micro-organismos representa um dos mecanismos primários pelos quais esses contaminantes são eliminados do ambiente (CHAILLAN *et al.*, 2004; WETLER-TONINIE *et al.*, 2010).

Bactérias de diferentes gêneros possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo e podem ser isolados dos mais diversos ambientes (ROSATO, 1997). Em ecossistemas não poluídos eles correspondem a menos de 1% da comunidade microbiana e em ambientes contaminados podem representar até 100% dessa comunidade (RISER-ROBERTS, 1992). Dentre os gêneros considerados bons degradadores de hidrocarbonetos, pode-se destacar *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* (LEAHY & COLWELL, 1990; JACQUES *et al.*, 2007, MANDRI & LIN, 2007; SEO *et al.*, 2009). O isolamento e cultivo destes micro-organismos têm revelado essa diversidade e fornecido informações sobre a composição da comunidade e perfis de biodegradação, que podem possibilitar uma melhor compreensão das preferências metabólicas dos micro-organismos (MAGOT *et al.*, 2000; CHAILLAN *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2009).

A capacidade microbiana em degradar os hidrocarbonetos, possivelmente se deve ao fato deles estarem presentes em toda a biosfera (WETLER-TONINIE *et al.*, 2010), o que favorece a pressão seletiva no sentido de criação de vias metabólicas e mecanismos de tolerância. Esse processo envolve diferentes genes e enzimas, incluindo monooxigenases e hidrolases, tais como epóxido hidrolases e esterases (ESPÓSITO, 2004; VASCONCELLOS *et al.*, 2009).

A capacidade de degradar e a via de degradação de um determinado composto variam de um micro-organismo para o outro (RODRIGUES, 2002). Além disso, as enzimas de degradação são altamente específicas, tanto para as reações catalisadas quanto na seleção do substrato utilizado e por isso, para cada tipo de hidrocarboneto existe um grupo de enzimas envolvidas na degradação (RODRIGUES, 2002). Isso faz com que a degradação ocorra por meio da associação de micro-organismos de diferentes espécies e gêneros e especializados em degradar uma ou mais frações do óleo, por meio da formação de consórcios (TIBURTIUS *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2007).

De modo geral, os componentes de petróleo de baixo peso molecular, como alcanos de cadeia curta e hidrocarbonetos aromáticos são mais facilmente degradados por muitos micro-organismos (ZHANG *et al.*, 2011). Já cicloalcanos, alcanos de cadeia longa e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são mais recalcitrantes devido à sua baixa solubilidade, o que dificulta sua captação pelas células microbianas (KANALY & HARAYAMA, 2000; ROJO, 2009). Entretanto, já foram isolados vários micro-organismos capazes de degradar alguns cicloalcanos, como o ciclohexano (KOMA *et al.*, 2005) e também micro-organismos capazes de degradar HPAs, principalmente, de baixo peso molecular (com 2 ou três anéis) que são relativamente voláteis e solúveis (MROZIK *et al.*, 2002).

Marchal e colaboradores (2003) analisaram a biodegradabilidade de gasolina e óleo diesel utilizando microbiota aeróbia isolada de um sistema de tratamento de esgoto. A biodegradabilidade da gasolina foi de 96% e do diesel entre 60 e 71%. Os hidrocarbonetos recalcitrantes foram os cicloalcanos e os alcanos ramificados, em particular os que possuíam átomos de carbono quaternários ou grupos substituintes na cadeia carbônica principal. A taxa de degradação dos hidrocarbonetos foi de quase 100% para combustíveis ricos em alcanos lineares.

As vias de biodegradação microbiana aeróbias de hidrocarbonetos são bem conhecidas (GIBSON, 1984) e essa é a via mais comum (LEAHI & COLWELL, 1990). Independente do hidrocarboneto, a etapa principal de degradação dessa via é a adição de um ou dois átomos de oxigênio ao hidrocarboneto, por enzimas monooxigenases e dioxigenases, respectivamente. Isso os torna mais solúveis em água, facilitando as reações enzimáticas subsequentes (GUIMARÃES, 2007). Durante muito tempo, acreditou-se que a biodegradação de hidrocarbonetos era um processo unicamente aeróbio (EVANS *et al.*, 1971). Atualmente, sabe-se que muitas bactérias anaeróbias também participam desse processo. Em 1991, foi reportada por Aeckersberg e colaboradores a descoberta de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que eram capazes de mineralizar hexadecano e, desde então, muitos trabalhos têm reportado a biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos, principalmente por esse grupo de bactérias (VASCONCELOS, 2006).

Para que ocorra a degradação de derivados de petróleo, além da presença de micro-organismos com vias degradativas dos componentes, diversos fatores ambientais como pH, temperatura, umidade, oxigênio dissolvido, dentre outros, também devem estar em condições adequadas aos micro-organismos, pois caso contrário, limitam a biodegradação (BOOPATHY, 2000). Isso reforça a importância da bioestimulação, que por adequar essas condições, proporciona uma rápida diminuição no pool da maioria dos hidrocarbonetos biodisponíveis, (MARGESIN & SCHINER, 2001; FRANKENBERGER *et al.*, 2005).

A degradação de alguns hidrocarbonetos do petróleo, como os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEXs, também pode ser limitada pela toxicidade dos mesmos, de modo que micro-organismos que possuam mecanismos de tolerância a esses compostos poderiam ser capazes de degradá-los mais eficientemente (RAMOS *et al.*, 1995; PAJE *et al.*, 1997). Outro fator que também pode limitar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em efluentes é a baixa disponibilidade dos mesmos à ação microbiana (MIHELICIC *et al.*, 1993). Por isso, esse processo é maximizado quando há micro-organismos capazes de produzir CAS, que promovem a solubilização e/ou emulsificação desses contaminantes, aumentando a sua concentração no meio aquoso (SHAFI & KHANNA, 1995; HARAYAMA *et al.*, 1999).

2.3.1) Vias de degradação

2.3.1.1) Degradação de compostos alifáticos

Na degradação aeróbia de compostos alifáticos, o ataque inicial a alcanos e cicloalcanos requer a utilização de oxigênio para a ativação da molécula (ROJO, 2009). As enzimas que catalisam esse ataque são as monooxigenases, que pertencem a diferentes famílias e são específicas para o grupo de substratos (VAN-BEILEN & FUNHOFF, 2007; ROJO, 2009). Essas enzimas fazem parte do complexo enzimático monooxigenase Citocromo P450 e que necessitam de um doador externo de elétrons que transfere o número de elétrons necessários para essa ativação de oxigênio e hidroxilação do substrato (GUIMARÃES, 2009) (Figura 1).

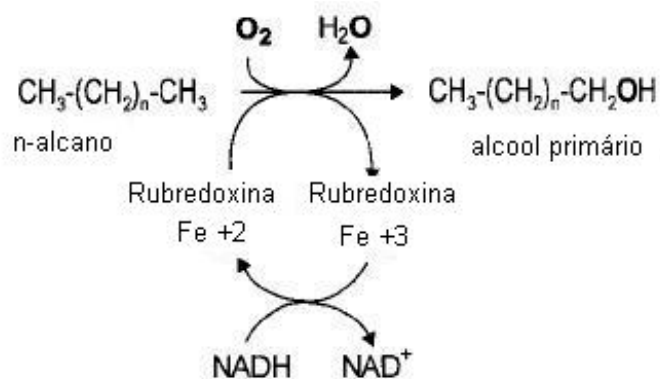


Figura 1: Adição de oxigênio à compostos alifáticos por monooxigenases (FRITSCHER & HOFRICHTER, 2000).

A degradação de alcanos contendo dois ou mais átomos de carbono pode ocorrer por duas vias distintas, a via terminal e a subterminal, sendo a via terminal a principal e mais comum. Na via terminal, ocorre a oxidação de um grupo metil terminal pela alcano-monooxigenase, com a formação de um álcool primário. Posteriormente, esse álcool primário é oxidado a um aldeído correspondente, pela atuação da enzima álcool desidrogenase (AD) e subsequentemente a um ácido graxo, pela enzima aldeído desidrogenase (ALD). Por fim, os ácidos graxos são conjugados à coenzima A (CoA) e convertidos por um processo de β-oxidação ao acetil CoA que, por sua vez, é convertido a um intermediário das vias metabólicas centrais (FRITSCHER & HOFRICHTER, 2000; ROJO, 2009). Os n-alcanos com um número alto de átomos de carbono são degradados a propionil-CoA, que é carboxilado à metilmalonil CoA, que é posteriormente convertido a succinil CoA. Já ácidos graxos menores podem ser

diretamente incorporados em lipídeos de membrana, mas a maioria deles é canalizada para o ciclo do ácido tricarboxílico (FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2000). Em alguns casos, ambas as extremidades da molécula de n-alcanos são oxidados por essa via, com a formação final de um ácido graxo, que é oxidado por um processo de ω -didroxilação que ocorre no grupo metil-terminal desses ácidos graxos (posição ω), formando um ω -hidroxi-ácido graxo, que também é processado por um processo de β -oxidação a um ácido dicarboxílico (WATKINSON & MORGAN, 1990; ROJO, 2009; COON, 2005). (Figura 2).

A via de oxidação sub-terminal de n-alcanos também tem sido relatada para utilização de alcanos de cadeia longa em *Penicillium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhodococcus* sp. Q15 (YAMADA-ONODERA *et al.*, 2000). Nela o ataque inicial das monooxigenases leva a formação de um álcool secundário, que posteriormente é oxidado a uma cetona correspondente e, em seguida, oxidado por uma Baeyer-Villiger monooxigenase para formar um éster. Esse éster é hidrolisado por uma esterase, com a formação de um álcool primário, que é oxidado a ácido graxo, o qual, por um processo de β -oxidação, leva à formação de acetil CoA, intermediário da via metabólica central (ROJO, 2009) (Figura 2). Ambas as vias terminal e subterminal podem coexistir em alguns micro-organismos (ROJO, 2009).

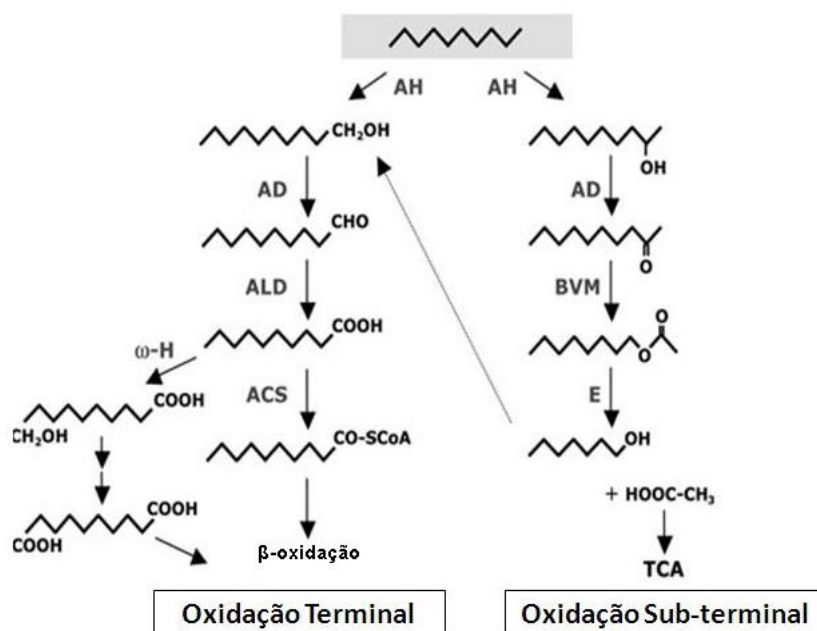


Figura 2: Vias de degradação aeróbica de alcanos, por oxidação terminal e subterminal. AH: alcano hidroxilase; AD: álcool desidrogenase; ALD: Aldeído desidrogenase; ACS: Acetil-CoA sintetase; ω -H: ω -hidroxilase; BMV: Baeyer-Villiger monooxigenase; E: Esterase; TCA: ácido tricarboxílico (Adaptada de ROJO, 2009).

2.3.1.2) Degradação de compostos aromáticos

Na degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos em geral, esses compostos frequentemente são convertidos enzimaticamente a intermediários dihidroxilados centrais, incluindo o catecol e o protocatecoato (Figura 3). Isso ocorre por meio da modificação dos grupos laterais do anel por processos de hidroxilação, desmetilação ou descarboxilação. (RISER-ROBERTS, 1998; CHAUAN *et al.*, 2008; WETLER-TONINI *et al.*, 2010).

Posteriormente, esses intermediários são clivados por um processo de oxidação do anel aromático pelas enzimas dioxigenases, que podem ser divididas em dois grupos de acordo com o local da clivagem no intermediário central. As enzimas intradiol abrem o anel aromático entre os dois átomos de carbono hidroxilados pela via de orto clivagem. A enzima catecol 1,2-dioxigenase é a enzima responsável pela clivagem do catecol, enquanto protocatecol 3,4 dioxigenase atua sobre o protocatecoato. As enzimas extradiol realizam a abertura do anel aromático adjacente aos átomos de carbono hidroxilados pela via de meta clivagem. Se o intermediário for o catecol, a enzima que realiza a clivagem é a catecol 2,3-dioxigenase, enquanto protocatecol 4,5-dioxigenase realiza a clivagem do protocatecoato (CADWELL, 2000).

As enzimas catecol 1,2 e 2,3-dioxigenases possuem o Fe^{3+} como o cofator, mas catecol 1-2 dioxigenase leva à produção do ácido cis,cis-mucônico ou um derivado e catecol 2,3-dioxigenase do 2-hidroximucônico semialdeído ou um derivado (DÍAZ, 2004; CHAUAN *et al.*, 2008; WOJCIESZYNSKA *et al.*, 2011). Esses produtos são convertidos em compostos que entram no ciclo de Krebs. O ácido cis-cis-mucônico é convertido em succinato e acetil-coA e o semialdeído 2-hidroximucônico em piruvato e acetaldeído (WETLER-TONINI *et al.*, 2010) (Figura 4).

Todos os HPAs possuem o mesmo processo geral de degradação, mas a eficiência cinética da via e os intermediários produzidos na reação dependem do número de anéis aromáticos destas moléculas. Em condições anaeróbias, diversos compostos inorgânicos, como os íons férricos, nitrato e sulfato, funcionam como aceptores de elétrons e os hidrocarbonetos aromáticos são degradados por conversões redutoras (CHAUAN *et al.*, 2008).

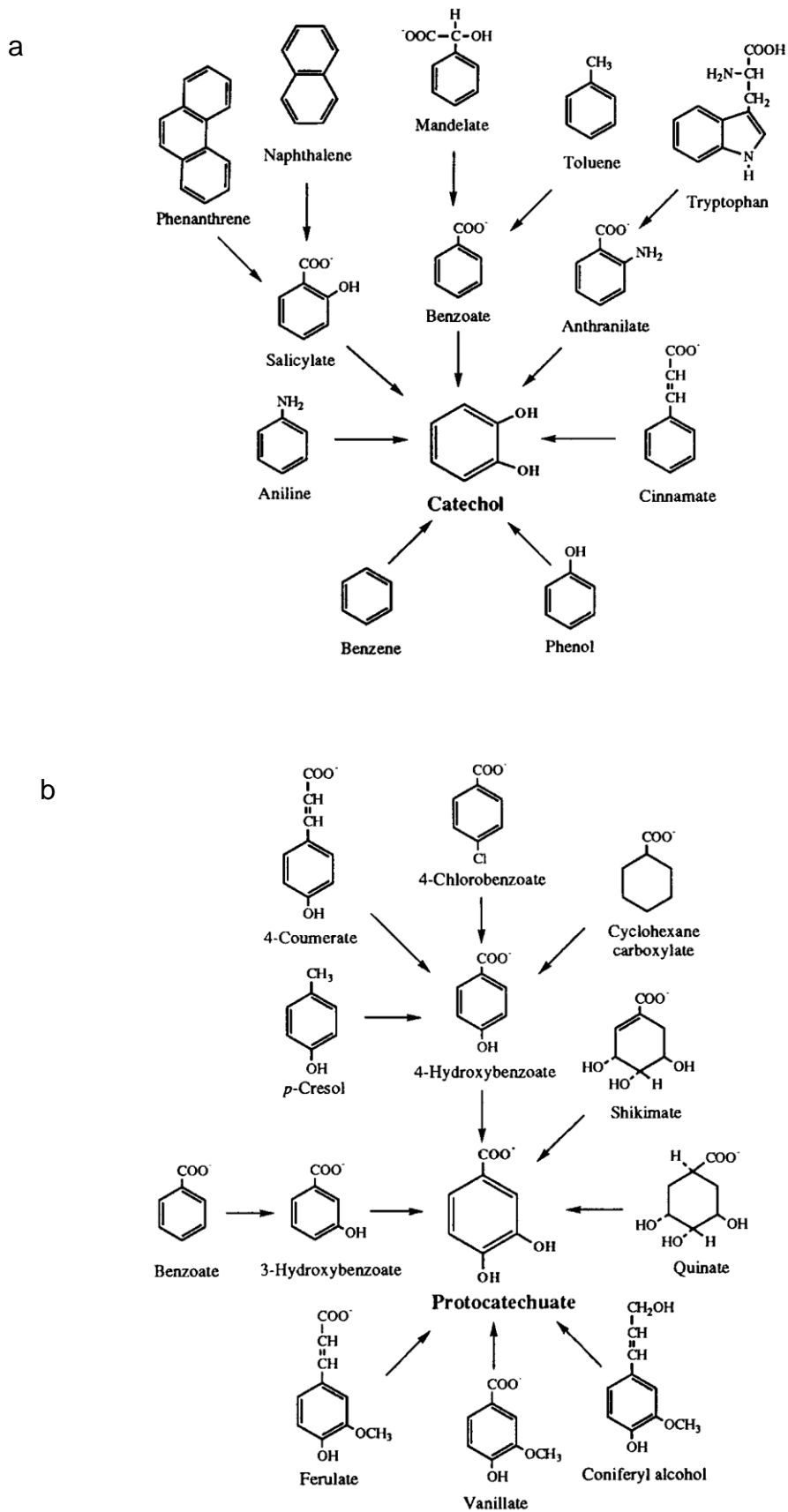


Figura 3: Conversão de compostos aromáticos oxidados ao A) catecol e B) protocatecoato, um dos intermediários centrais da via aeróbica de degradação desses compostos (adaptado de HARWOOD & PARALES)

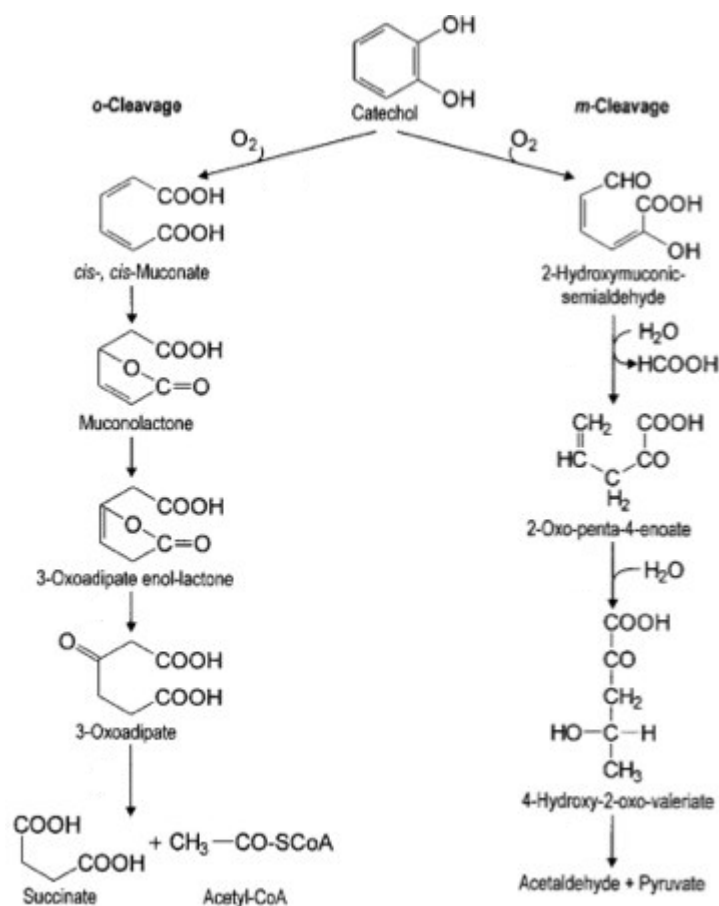


Figura 4: Vias de orto e meta clivagem de degradação aeróbia de compostos aromáticos (adaptado de FRITSCHÉ & HOFRICHTER, 2000).

2.4) Prospecção de produtos microbianos de bactérias de efluentes industriais

Embora os micro-organismos sejam considerados essenciais para o meio ambiente e contribuam para a estabilidade ambiental, sendo responsáveis pela ciclagem de compostos químicos e degradação de poluentes ambientais, o conhecimento de sua diversidade, riqueza, distribuição e função no ecossistema, permanece ainda bastante incompleto (STALEY, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Estima-se que menos de 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido cultivados, caracterizados e descritos (STALEY, 1998).

Os benefícios científicos de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são muitos (COLWELL, 1997). Em termos ambientais, possibilitam a melhor compreensão das funções exercidas pela comunidade microbiana e suas interações com outras espécies. Em termos econômicos, os benefícios estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos

processos biotecnológicos, seja para aplicações industriais através da produção de antibióticos, agentes terapêuticos, produtos químicos, enzimas e polímeros, ou para uso em processos de biorremediação de vazamentos de petróleo e resíduos tóxicos, tratamento de resíduos industriais e águas residuárias, biolixiviação e recuperação de minério (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os micro-organismos, juntamente com as plantas, têm sido considerados as principais fontes de moléculas biologicamente ativas e úteis (PUPO *et al.*, 2007). Na indústria, a exploração de produtos microbianos gera bilhões de dólares a cada ano e o sucesso de suas aplicações está relacionado com a diversidade de moléculas com diferentes funções que eles produzem como resultado de seu metabolismo primário e secundário (HUNTER-CEVERA, 1998; KURTBOKE *et al.*, 2004).

Assim, o aumento da quantidade e diversidade de compostos químicos disponíveis às aplicações industriais é dependente da exploração da diversidade microbiana em diferentes ambientes e muitos são os benefícios em decorrência dessa exploração (COLWELL, 1997). Nesse contexto, técnicas microbiológicas e de biologia molecular para isolamento, identificação, cultivo e manutenção de micro-organismos são essenciais para as buscas de novos produtos naturais (PUPO *et al.*, 2007).

Fontes de biodiversidade menos exploradas ou inexploradas são focos de interesse e pesquisas na busca de novos produtos microbianos de interesse biotecnológico (JOHNSON, 2001). Entre essas fontes, destaca-se os ambientes extremos, nos quais micro-organismos extremofílicos vivem em condições ambientais de temperaturas extremamente altas ou baixas, escassez de umidade e luminosidade, grandes variações de pH, baixos teores de nutrientes e altos níveis de metais pesados e compostos tóxicos, como solventes orgânicos (SATYANARAYANA *et al.*, 2005). Esse interesse se deve ao fato de que micro-organismos isolados nesses ambientes, frequentemente, apresentam mecanismos de adaptação às condições físico-químicas do ambiente em que habitam, o que os tornam adequados a uma série de aplicações biotecnológicas (JOHNSON, 2001).

Assim, o desenvolvimento de tecnologias baseadas no uso de micro-organismos para o tratamento de efluentes industriais, visando à retirada dos compostos recalcitrantes e tóxicos dos mesmos, requer o isolamento, a identificação e a caracterização de micro-organismos desses efluentes

2.4.1) Produção de compostos ativos de superfície (CAS)

Os Compostos ativos de superfície (CAS) correspondem a uma importante classe de compostos químicos, amplamente usados em diversos setores industriais. Eles são moléculas anfipáticas, constituídas de uma cauda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica. A parte apolar, hidrofóbica é constituída, geralmente, por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a parte polar pode ser iônica, não iônica ou anfotérica (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Em função da presença dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os CAS possuem características tenso-ativas, ou seja, são capazes de se associarem e interagirem espontaneamente entre interfaces líquidas (óleo/água e água/óleo) com diferentes graus de polaridade. Com isso, eles reduzem a tensão superficial e interfacial, levando a formação de grandes agregados moleculares, denominados de micelas, que se acumulam na superfície desses líquidos imiscíveis, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos e orgânicos (BANAT *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2007). Devido a essas propriedades, os CAS possuem características de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases, dentre outros (BANAT *et al.*, 2000).

A eficiência de um CAS é medida por meio de um parâmetro denominado concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a concentração mínima do tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas. CAS eficientes apresentam baixa concentração micelar crítica, ou seja, menores concentrações são necessárias para reduzir a tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

A maioria dos CAS disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a crescente preocupação ambiental tem levado à busca de produtos naturais, como alternativa aos produtos já existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os CAS microbianos constituem um grupo diverso de moléculas com propriedades tenso-ativas e são subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Várias moléculas, com estruturas químicas diversas podem atuar como biossurfactantes, incluindo glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, dentre outros (MESQUITA, 2004). O tipo de micro-organismo, substrato de crescimento e condições de cultivo determinam a

composição dos biossurfactantes (PUNTUS *et al.*, 2005), sendo produzidos em grande quantidade por bactérias isoladas do solo, da água do mar, de sedimentos marinhos, áreas contaminadas com óleos, dentre outras (BARROS *et al.*, 2007).

CAS microbianos podem ser divididos em duas categorias baseadas no peso molecular. Os biossurfactantes são, geralmente, os compostos com baixo peso molecular, que consistem de glicolípídeos ou lipopeptídeos de cadeia curta e são mais aptos em diminuir a tensão superficial em sistemas aquosos. Aqueles com alto peso molecular, geralmente poliméricos ou lipopeptídicos, são denominados de bioemulsificantes e são responsáveis pela formação e estabilidade de emulsões sem necessariamente serem capazes de reduzir a tensão superficial do meio já que não possuem obrigatoriamente composição anfipática (BENTO *et al.*, 2008; CHOPADE *et al.*, 2010).

CAS microbianos com propriedades surfactantes ou emulsificantes possuem propriedades físico-químicas e aplicações semelhantes às dos surfactantes sintéticos, mas são mais eficientes e possuem muitas vantagens em relação a eles (KOSARIC, 2001). Dentre as vantagens, pode-se destacar sua diversidade química, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, possibilidade de produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através de engenharia genética ou bioquímica, maior seletividade e estabilidade em valores extremos de pH, temperatura e concentração salina, alta atividade espumante, excelente atividade superficial, interfacial e de emulsificação (KOSARIC 1993; RON & ROSENBERG, 2002; MARQUÉS *et al.*, 2009). Isso faz com que o interesse nesses compostos venha aumentando nos últimos anos (PLAZA *et al.*, 2008).

CAS microbianos podem ser utilizados em várias atividades, de diferentes setores econômicos (MUTHUSAMY *et al.*, 2008). Na indústria farmacêutica, eles têm sido empregados como antibióticos e antifúngicos; na indústria de alimentos, de herbicidas e pesticidas, como agentes emulsificantes; na indústria de material de limpeza, para produção de sabões e detergentes; na mineração, podem ser aplicados como agentes espumantes ou como agentes quelantes de metais (NITSCHKE & PASTORE, 2002; LIMA, 2003). Mas o maior mercado para sua aplicação é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo, incorporados em formulações de óleos lubrificantes e na recuperação avançada de petróleo (SINGH *et al.*, 2007).

São utilizados também na biorremediação de ambientes contaminados com derivados de petróleo e em sistemas de tratamento biológico de efluentes oleosos, por serem capazes de reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, possibilitando a emulsificação, solubilização e dispersão dos hidrocarbonetos desse material. Isso permite sua interação inicial com a microbiota tornando-o disponível à biodegradação (NITSCHKE & PASTORE, 2002; LIMA, 2003; SINGH *et al*, 2007).

Assim, um grande número de micro-organismos produtores de CAS vem sendo isolado de diversos ambientes como solo, sedimentos, lodos, ambientes marinhos, água doce e de áreas contaminadas com derivados de petróleo além dos próprios reservatórios de óleo, o que torna esses ambientes sítios ideais para pesquisas com o intuito de isolar micro-organismos produtores (FRANKENBERGER *et al.*, 2005; TABATABAEE *et al.*, 2005; CALVO *et al.*, 2008; RUGGERI *et al.*, 2009; CHOPADE *et al.*, 2010). Os micro-organismos comumente relatados como produtores dessas moléculas incluem aqueles pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Halomonas*, *Nocardia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Candida* e espécies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Thiobacillus thiooxidans*, dentre outras (LIN *et al.*, 1994; DESAI & BANAT., 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; PHAM *et al.*, 2004; NITSCHKE & PASTORE, 2006; LIMA, 2008 CHOPADE *et al.*, 2010).

Diversos autores já relataram um aumento da capacidade de biorremediação de ambientes contaminados com derivados de petróleo, pela presença de micro-organismos produtores de CAS ou pela adição direta dessas moléculas (OBERBREMER *et al.*, 1990; TREVORS *et al.*, 1992; RAHMAN *et al.*, 2002; PROVIDENTI., 2005). Barathi e Vasudevan (2001) observaram que uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* isolada de solo contaminado com petróleo possuía a capacidade de utilizar *n*-hexadecano, *n*-decano, querosene e óleo cru adicionados em meio mínimo mineral, sendo que a degradação de *n*-hexadecano era acompanhada pela produção de biossurfactante. Meng e colaboradores (2009) avaliaram o aumento da degradação de efluente sintético contaminado com óleo cru e óleo lubrificante, em um sistema de lodos ativados, após a adição do caldo proveniente da fermentação de uma linhagem de *Pseudomonas* produtora de raminolipídeos. A presença dos raminolipídeos a uma concentração de 12,1 mg L⁻¹ aumentou a eficiência de

degradação do óleo cru de 22,3% para mais de 80% e a uma concentração de 22,5 mg L⁻¹ aumentou a eficiência de degradação do óleo lubrificante de 24% para 92%

No entanto, a aplicação dos CAS tem sido limitada devido à dificuldade de seu isolamento e purificação e pela sua baixa produção, devido à falta de linhagens microbianas com alta capacidade de produção dos mesmos, que resulta em alto custo, quando comparado com os surfactantes químicos (KIM *et al.*, 1997; UYSAL & TURKMAN, 2005).

Há diversas maneiras de otimizar a produção dos CAS microbianos. Uma delas consiste em otimizar as condições físicas e químicas de produção, considerando que o tipo, a qualidade e a quantidade de CAS produzidos por micro-organismos estão diretamente relacionados com a quantidade e a qualidade dos nutrientes presentes no meio de cultivo. Também as condições físicas de crescimento, como temperatura, salinidade, pH, disponibilidade de oxigênio e agitação influenciam na produção dos CAS uma vez que influenciam o crescimento e atividade celular (DESAI & BANAT, 1997).

Outra alternativa para diminuir os custos de produção desses compostos é a utilização de substratos alternativos, principalmente resíduos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos e lipídeos, como resíduos de óleos de fritura, de refinarias de petróleo, soro de leite, melaço, amido, manipueira, dentre outros (FOX & BALA, 2000; BEDNARSKI *et al.*, 2004; NITCKE & PASTORE, 2006; DESAI *et al.*, 2008a).

2.4.2) Produção de enzimas

As enzimas são catalisadores naturais muito importantes nos processos industriais devido à sua ação rápida e eficiente em baixas concentrações, seu alto grau de especificidade para o substrato e baixa toxicidade (DEMAIN, 1981; HASAN *et al.*, 2006). Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, de alimentos e ambiental utilizam processos enzimáticos em várias de suas etapas (PANDEY *et al.*, 1999). Assim, o uso industrial das enzimas têm se desenvolvido rapidamente e está ganhando cada vez mais atenção, sendo as enzimas hidrolíticas as mais utilizadas devido à sua aplicação na degradação de várias substâncias naturais (OGAWA & SHIMIZU, 1999; KIRK *et al.*, 2002).

A maioria das enzimas relevantes para a indústria é de origem microbiana, por isso o isolamento e triagem de micro-organismos produtores de enzimas de interesse

industrial é um ponto importante para o desenvolvimento de bioprocessos industriais (FENNIRI, 1996; DEMIRJIAN *et al.*, 1999; UCHIYAMA & MIYAZAKI, 2009). Elas são mais atrativas que as enzimas derivadas de plantas e animais devido à grande variedade de atividades catalíticas que possuem, o menor custo de produção em larga escala em fermentadores industriais, maior estabilidade e facilidade de manipulação genética (OLIVEIRA, 2006).

Apesar de sua importância há um grande número de micro-organismos existentes que não foram testados como fontes de enzimas e a gama de reações capazes de serem catalisadas por elas ainda irá se expandir muito. Cepas bacterianas são geralmente mais utilizadas, pois oferecem atividade superior em comparação com as leveduras, além de terem pH ótimo neutro ou alcalino e serem termoestáveis (FROST & MOSS, 1987).

Heath e colaboradores (2009), por exemplo, identificaram uma nova esterase a partir do “screening” de uma biblioteca metagenômica gerada a partir de uma amostra de solo desértico Antártico, que se mostrou ativa em uma faixa de temperatura de 7° C a 54° C e apresentou similaridade muito baixa (menos de 29% de identidade de aminoácidos) com as esterases depositadas no banco de dados GenBank.

Padmapriya e colaboradores (2011) testaram a produção de enzimas lipases por micro-organismos do gênero *Lactobacillus* isolados de amostras de solo, leite e coco, e conseguiram obter uma lipase que se mostrou estável em pH alcalino e na faixa de temperatura de 9 °C a 40 °C.

Diversas metodologias podem ser aplicadas para a detecção de enzimas, mas os ensaios enzimáticos em microplacas são os mais utilizados, sendo realizados no formato de triagem de alto desempenho (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) constituindo uma ferramenta essencial para a prospecção de enzimas microbianas, devido à sua simplicidade, possibilidade de miniaturização e velocidade de execução dos ensaios. (CARLÓN *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ *et al.*, 2003; CHEN, 2006; VASCONCELOS, 2006; MANTOVANI *et al.*, 2010).

Dentre as várias metodologias existentes para detecção enzimática, os ensaios envolvendo sondas cromogênicas e fluorogênicas, são os mais utilizados, e consistem no uso de substratos capazes de liberar um cromóforo ou fluoróforo, como consequência da reação enzimática, e que podem ser facilmente detectados por espectrofotometria. Ensaios que envolvem a utilização de sondas fluorogênicas são

extremamente vantajosos quando comparados aos que utilizam sondas cromogênicas, pois permitem elevada sensibilidade e necessitam de pequena concentração de substrato no meio reacional. (CHEN, 2006). Um modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona foi proposto por Reymond & Wahler (2001) para enzimas monooxigenases e hidrolases isoladas, sendo adaptado em conjunto com o grupo de pesquisa da Dra Anita J. Marsaioli, para células íntegras. O ensaio consiste em uma sequência de reações, no qual, após a catálise enzimática, os substratos fluorogênicos dão origem a produtos, que pela ação de NaIO₄ (periodato de sódio) e/ou BSA (albumina do soro bovino) liberam o ânion umbeliferona, que é fluorescente e pode ser detectado a 460 nm (Figura 5). No caso da ação das hidrolases sobre as sondas os produtos obtidos são os dióis e no caso da atuação de monooxigenases sobre as sondas os produtos obtidos são ésteres ou lactonas.

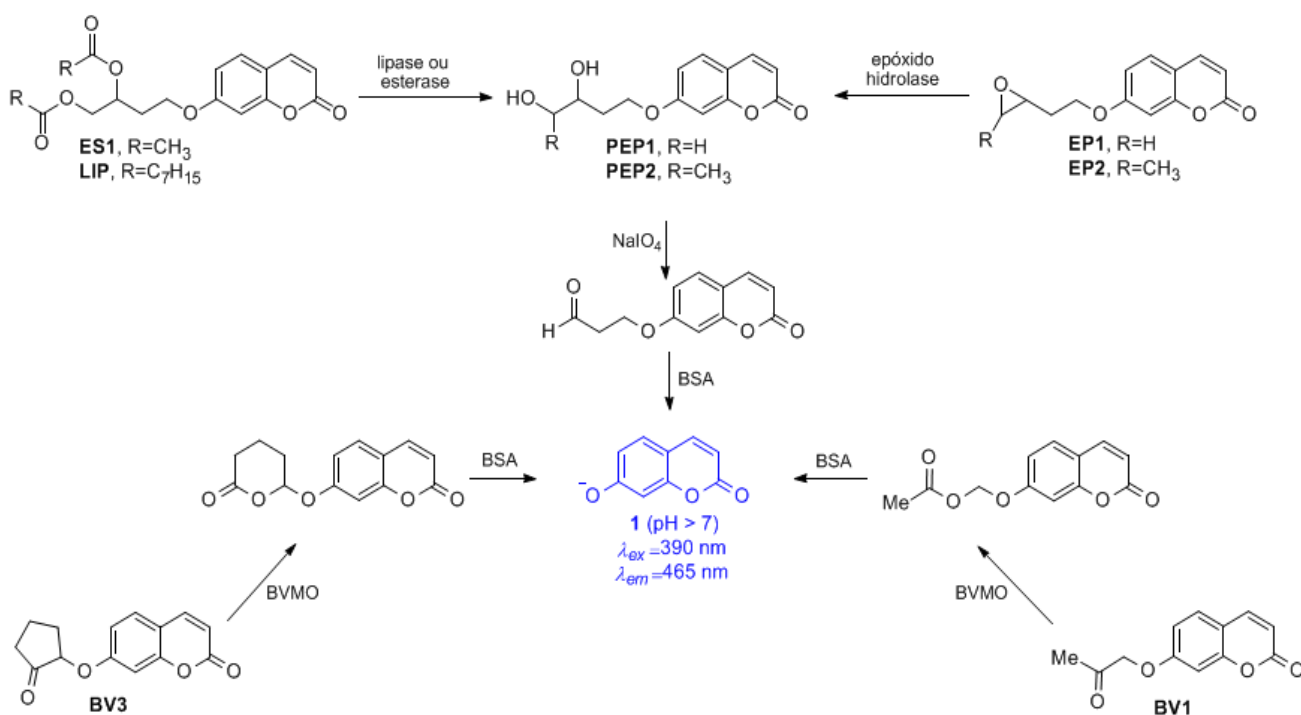


Figura 5. Modelo de ensaio enzimático utilizando sondas fluorogênicas derivadas de umbeliferona para a triagem de hidrolases e monooxigenases. ES1- sonda para detecção de esterases, LIP-sonda para detecção de lipases, EP1-sonda para detecção de epóxido hidrolases terminais, EP2- sonda para detecção de epóxido hidrolases não terminais, BV1- sonda para detecção de Baeyer Villiger monooxigenases do grupo 1, BV3- sonda para detecção de Baeyer Villiger monooxigenases do grupo 3, BVMO- Baeyer-Villiger monooxigenases.

As hidrolases, monoxigenases e demais enzimas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos são de grande importância. No passado, muitos trabalhos que estudaram aspectos básicos e aplicados das vias degradativas desses compostos conseguiram caracterizar essas enzimas e seus genes e a utilização delas também como biocatalisadoras na indústria. Assim, em adição a sua aplicação na biorremediação, essas enzimas biodegradativas são úteis em diversos setores industriais (PARALES & HADDOCK, 2004). Esterases, por exemplo, têm sido utilizadas para catalisar reações de hidrólises, esterificações e transesterificações, o que torna esses biocatalisadores versáteis e importantes ferramentas nas indústrias. Adicionalmente, são enzimas que não necessitam de cofatores e possuem alta estabilidade em meio aquoso e em fase orgânica (MANTOVANI *et al.*, 2010). As enzimas epóxido hidrolases, também são utilizadas em processos de hidrólise e o interesse na utilização dessas enzimas é crescente pelo fato de não necessitarem de cofatores e possuírem uma vasta gama de substratos (CHEN, 2006). Já as enzimas lipases possuem significativo potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso, utilizando processos simplificados com altos rendimentos. Podem catalisar, além da hidrólise, a síntese de uma ampla gama de diferentes ésteres carboxílicos e por isso importantes produtos industriais podem ser produzidos com maior rapidez e especificidade pela utilização dessas enzimas (HASAN, 2006).

Assim, enzimas produzidas por micro-organismos, sejam elas degradativas ou não, são de extrema relevância e aplicabilidade e, dentro desse contexto, ensaios que visem identificar a produção dessas enzimas por diferentes isolados microbianos têm se tornado uma prática cada vez mais comum nos ensaios de prospecção.

3. OBJETIVOS

3.1) Geral

Isolar, identificar e realizar a prospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de Compostos Ativos de Superfície (CAS) e enzimas hidrolíticas/oxidativas, com potencial de aplicação na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e em outros processos industriais, a partir de efluentes oleosos obtidos de uma Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI).

3.2) Específicos

- Caracterizar o efluente oleoso quanto à população de bactérias heterotróficas totais e degradadoras dos hidrocarbonetos presentes nos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene, pelo cálculo de UFC mL⁻¹ e pela técnica de número mais provável (NMP).
- Avaliar a diversidade metabólica e perfil funcional da comunidade microbiana presente no efluente oleoso, de acordo com o padrão do consumo de fontes de carbono utilizando o sistema Biolog-ECOPLATE.
- Isolar bactérias capazes de crescer e degradar os hidrocarbonetos presentes no querosene, parafina, óleo lubrificante, óleo recuperado e óleo bruto obtidos da ETEI, a partir de métodos de enriquecimento em meio mineral suplementado com esses combustíveis.
- Identificar os isolados bacterianos por meio de técnicas morfo-fisiológicas e moleculares e determinar a frequência relativa dos gêneros observados.
- Avaliar os isolados bacterianos quanto à capacidade de crescer em meio mineral suplementado com óleo bruto e produzir compostos emulsificantes e surfactantes a partir de glicose e óleo bruto.

- Caracterizar os isolados bacterianos capazes de crescer no óleo bruto, quanto à presença de atividade das enzimas degradativas catecol-dioxigenases e alceno hidroxilases.

- Caracterizar os isolados bacterianos capazes de crescer no óleo bruto, quanto à atividade de monooxigenases, epóxido hidrolases, esterases e lipases, por meio de técnicas de triagem enzimática de alto desempenho (HTS).

- Caracterizar os isolados selecionados quanto ao rendimento da produção dos CAS, seguido da avaliação da composição química parcial e capacidade das biomoléculas em formarem emulsões estáveis com diferentes substratos hidrofóbicos.

- Quantificar a porcentagem de remoção de óleo pelos isolados que apresentarem as melhores propriedades de crescimento no óleo bruto, produção de CAS e enzimas degradativas em ensaios de degradação em sistema de batelada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Amostragem

No estudo três amostras de efluentes oleosos, provenientes de uma refinaria de petróleo localizada na cidade de Betim/Minas Gerais, foram coletadas de uma lagoa aerada de mistura completa da Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETEI) localizada na própria refinaria. Essas amostras foram utilizadas para o isolamento de bactérias aptas à crescer/degradar hidrocarbonetos de petróleo, que foram avaliadas ao longo de todo o experimento.

Adicionalmente, foram coletadas amostras do óleo recuperado no processo físico de tratamento (separador água-óleo) da ETEI e do óleo bruto da própria refinaria, os quais foram utilizados nos ensaios de isolamento, emulsificação e biodegradação. As amostras de efluentes oleosos e todas as demais foram armazenadas em frascos de vidros estéreis e acondicionadas em caixas de isopor com gelo durante o transporte até o Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) no Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG) onde foram processadas em um período de 24 h.

4.2) Isolamento e determinação da densidade de bactérias presentes no efluente oleoso

Alíquotas de 1 mL das três amostras dos efluentes oleosos foram diluídas serialmente em solução salina estéril (NaCl a 0,85% p/v) até a diluição 10^{-7} e utilizadas para o isolamento de bactérias e determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de hidrocarbonetos.

4.2.1) Isolamento e quantificação de bactérias morfologicamente distintas presentes nos efluentes oleosos

Para o isolamento das bactérias alíquotas de 0,1 mL das diluições decimais foram espalhadas no meio ágar-BHI - Brain Heart Infusion - (DIFCO), com o auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas a 30 °C até o crescimento das colônias. Após a incubação, as colônias morfologicamente diferentes foram quantificadas e purificadas em meio ágar-BHI.

4.2.2) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene

A população de bactérias heterotróficas totais e capazes de degradar hidrocarbonetos, presentes nas amostras, foi determinada pelo método do NMP. A determinação da população bacteriana total foi realizada em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia de Binet e colaboradores (2000), com modificações. Para tal, alíquotas de 25 μL das diluições 10^{-1} a 10^{-7} foram inoculadas nos poços da microplaca contendo 200 μL de meio BHI, sendo realizadas seis repetições para cada diluição. Posteriormente as placas ficaram incubadas por 1 semana a 30 °C.

Para o cálculo do NMP mL^{-1} de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foi utilizado o meio mineral para bactérias (MMB), contendo por litro: 1,5 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3,0 g de NH_4NO_3 ; 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,02% de extrato de levedura, suplementado com as fontes de carbono: óleo lubrificante, querosene e parafina. A metodologia utilizada foi a descrita por Wrenn & Venosa (1996), com modificações. Primeiramente, foram adicionados aos poços da microplaca 180 μL do MMB, 5 μL de querosene, óleo lubrificante ou parafina e 20 μL de cada diluição, sendo realizadas seis repetições para cada diluição. As placas foram vedadas com selante e incubadas por duas semanas a 30 °C.

Após os respectivos períodos de incubação foi adicionado aos poços das microplacas 50 μL da solução aquosa do indicador redox 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) na concentração de 3g L^{-1} . Durante oxidação das fontes de carbono pelos micro-organismos, os elétrons são transferidos para o TTC, que tem sua coloração alterada de incolor para rosa. Após 24 h, o crescimento foi avaliado por meio de observação visual da coloração rosa nos poços e pela medida da densidade óptica a 485 nm. Foram considerados positivos os poços de cada diluição, cujas densidades ópticas diferiram estatisticamente do controle, que no ensaio para determinação de bactérias heterotróficas totais consistiu de meio não inoculado e no ensaio para a quantificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de meio inoculado, mas sem a adição das fontes de carbono.

Após a determinação do número de poços positivos e negativos, para cada diluição, em ambos os ensaios, o cálculo do NMP mL^{-1} foi realizado com a utilização

do software da Microsoft Excel, associado a uma equação descrita em Brionnes e colaboradores (1999).

$$a_1 p_1 / 1 - e^{-a_1 x} + a_n p_n / 1 - e^{-a_n x} = a_1 n_1 + a_n n_n$$

na qual a é o volume inoculado no poço, p , o número de poços positivos, e n , o número de poços inoculados.

Adicionalmente, alíquotas dos poços considerados positivos para crescimento nas microplacas utilizadas para quantificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foram diluídas serialmente e plaqueadas em meio ágar-BHI. Após a observação do crescimento, as colônias que apresentaram diferenças morfológicas visuais foram quantificadas e purificadas também em meio ágar-BHI.

4.3) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana total das amostras

A diversidade metabólica da comunidade microbiana presente nas amostras foi avaliada com a utilização do sistema Biolog EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA), que mede a capacidade metabólica da comunidade em utilizar 31 diferentes fontes de carbono, gerando um padrão metabólico da mesma e sua potencial funcionalidade (Anexo 1). Cada poço contém um tipo de fonte de carbono e o corante INT (iodo nitro tetrazolio), sendo que há três poços para cada fonte. Durante oxidação das fontes de carbono, os elétrons são transferidos para o INT reduzindo-o e formando o composto insolúvel formazan, que possui coloração arroxeadada. Assim, o crescimento e utilização de cada uma das fontes é evidenciado pelo aparecimento dessa coloração nos poços e pode ser quantificado espectrofotometricamente pela leitura da densidade ótica a 590 nm, permitindo que o consumo de cada substrato seja acompanhado ao longo do tempo (GARLAND & MILLS, 1991).

Inicialmente, 30 mL dos efluentes foram homogeneizados, tiveram a DO_{600} lida e foram diluídos em salina 0,85% estéril, se necessário, para que a mesma atingisse um valor de 0,2. Após esses procedimentos, alíquotas de 150 μ L da suspensão foram adicionadas em cada poço do sistema Biolog EcoPlate, com o auxílio de uma pipeta multicanal. Uma placa foi utilizada para cada uma das três amostras coletadas. As placas foram incubadas a 30 °C e avaliadas quanto à alteração dos valores de

densidade ótica das culturas dos poços a 590 nm, utilizando leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan Spectrun, após 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias da inoculação. Para a determinação da diversidade metabólica da comunidade foram utilizados os dados de densidade ótica de cada uma das 31 fontes de carbono dos poços das placas ao longo do tempo.

4.4) Isolamento de bactérias com potencial de degradação de hidrocarbonetos pelo método de enriquecimento

Para a obtenção de isolados bacterianos pelo método de enriquecimento 10 g dos sólidos obtidos das amostras de efluentes oleosos, após centrifugação das mesmas à 23500 x g por 10 min, foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL do meio MMB ou BHI suplementados com o óleo bruto ou óleo recuperado a 2% (v/v). Os frascos ficaram incubados à temperatura ambiente, sob agitação de 180 rpm por 7 dias. Após esse período, 2 mL das culturas foram transferidas para um novo meio de cultura, contendo a mesma formulação, e submetidos a mais um período de incubação de 7 dias à temperatura ambiente, sob agitação de 180 rpm. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e após esses três subcultivos, a cultura foi diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-1} a 10^{-7} foram plaqueadas em meio BHI sólido e também em meio MMB sólido acrescido dos mesmos compostos a 2%, por incorporação. As placas foram incubadas à temperatura de 30 °C até o crescimento dos micro-organismos. As colônias que apresentaram diferenças morfológicas visuais foram quantificadas e purificadas em meio BHI sólido. Para a manutenção dos isolados, foram feitas culturas estoques em tubos inclinados com meio BHI, as quais foram mantidas a 4 °C, e utilizadas nos ensaios subsequentes, e a - 80 °C em criotubos contendo cultura em meio líquido BHI acrescido de glicerol (20% v/v). Todos os isolados obtidos foram caracterizados macroscopicamente quanto ao aspecto colonial e microscopicamente quanto à forma e arranjo das células além do tipo de reação tintorial à coloração de Gram.

4.5) Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares

Para a identificação, os diferentes isolados obtidos tiveram seu DNA extraído e regiões do gene do rRNA 16S amplificados por PCR.

4.5.1) Extração de DNA

Células dos isolados bacterianos cultivadas em meio BHI por 24 h a 37 °C foram utilizadas na extração do DNA genômico pelo método descrito por Pitcher e colaboradores (1989). Inicialmente as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹, pH 8) adicionado de lisozima (50 mg mL⁻¹) e os tubos foram adicionados de uma porção de esferas de vidro, vortexados por 2 min e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após o período de incubação as células foram lisadas com a adição de 600 µL de uma solução contendo tiocinato de guanidina 5 mol L⁻¹ (Sigma), EDTA (100 mmol L⁻¹, pH 8,0) e 0,5% (v/v) de sarcosil (GES reagent). Os tubos foram agitados por inversão e incubados por 10 min à temperatura ambiente para que ocorresse a lise. Os tubos foram resfriados pela incubação em banho de gelo por 2 min e, a seguir, adicionados de 300 µL de solução de acetato de amônio gelada (7,5 mol L⁻¹) e novamente agitados por inversão e incubados por mais 10 min no banho de gelo. Após esse período, 600 µL de uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados aos tubos. Após a homogeneização da mistura em agitador tipo vortex, os tubos foram centrifugados a 23500 x g por 10 min e a fase aquosa transferida para novos tubos nos quais era adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. Ao final desse processo, os tubos foram incubados a -20 °C por 12 h e, a seguir, centrifugados a 5055 x g por 20 min para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado duas vezes com etanol 70%. Após estarem totalmente secos os “pellets” foram ressuspensos em 50 µL de água livre de nucleases e estocados a 4 °C. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, e a concentração determinada em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm.

4.5.2) Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de regiões do gene do rRNA 16S

A amplificação de regiões do gene do rRNA 16S foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais para bactérias 8F (5'AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') (LANE, 1991) e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (MUYZER *et al.*, 1995). A reação de 50 µL era constituída de 10 µL de Taq Buf IVB (5X), 1µL de dNTP (10 mmol L⁻¹ de cada), 2,0 µL do oligonucleotídeo iniciador 8F (10 pmol L⁻¹), 2,0 µL do oligonucleotídeos iniciador 907R (10pmol L⁻¹), 0,5 µL de Taq DNA polimerase

(5U μL^{-1}) (Phoneutria) e 2,0 μL de DNA (90-120 ng μL^{-1}). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando o termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min seguido de 26 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, finalizado por extensão final de 72 °C por 5 min (KUSHMARO *et al.*, 2006), com modificações. O produto da PCR foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm e a integridade do fragmento, de aproximadamente 900 pares de bases, analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% com a utilização de um padrão de DNA ladder 1Kb.

4.5.3) Purificação dos amplicons

Para purificação dos produtos de PCR, foi adicionado aos tubos contendo a reação 11,25 μL de EDTA (125 mmol L^{-1}) e 135 μL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 20215 x g por 25 min para precipitação dos amplicons. O sobrenadante foi descartado e aos tubos de microcentrífuga foram adicionados 120 μL de etanol 70% (v/v). Os mesmos foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 20215 x g por 10 min e o sobrenadante novamente descartado. Após total evaporação do etanol residual o produto foi ressuspendido em 10 μL de água livre de nuclease. O produto obtido foi quantificado em Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm.

4.5.4) Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados para fins de identificação dos isolados. Os fragmentos foram enviados para a empresa MacroGen na Korea e analisados no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram editadas utilizando-se o programa SEQUENCHER version 4.1.4 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI) e sempre que possível as sequências geradas pelos primers “forward” e “reverse” foram alinhadas para gerar sequências consenso (contigues) que foram comparadas com sequências gênicas de rDNA depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado tinha que apresentar similaridade de 97% a outra já depositada no GenBank (STACKEBRANDT & GOEBEL., 1994).

4.5.5) Frequência relativa dos gêneros observados

Após a identificação dos diferentes isolados, foi calculada a frequência relativa dos gêneros obtidos separadamente para cada um dos métodos de isolamento, conforme a equação 1. Para tal, a frequência absoluta (f_a) dos gêneros presentes neles (somatório da contagem de UFC mL⁻¹ dos gêneros) foi dividida pelo somatório das frequências absolutas de todos os gêneros obtidos no método (total de contagens de UFC mL⁻¹ de todos os gêneros obtidos no método) e expressos em porcentagens.

Erro! Fonte de referência não encontrada.=Erro! Fonte de referência não encontrada.

na qual fr é a frequência relativa, fa a frequência absoluta e Tfa o somatório das frequências absolutas.

Equação 1: Equação para calcular a frequência relativa dos gêneros

4.6) Avaliação do crescimento e produção de Compostos Ativos de Superfície em meio mineral adicionado de glicose e óleo bruto

Isolados das culturas estoque foram ativados em meio ágar-BHI e, após o crescimento, uma alçada das células foi adicionada em frascos Erlenmeyer contendo 40 mL de meio BHI. Após 24 h, leituras de DO₆₀₀ foram realizadas para avaliar o crescimento dos isolados e os valores obtidos utilizados para determinação do volume do pré-inóculo a ser utilizado, de modo a se obter uma concentração final de 0,1 unidades de DO₆₀₀ nos frascos do ensaio. Os ensaios foram realizados em frascos de penicilina contendo 40 mL de meio MMB suplementado com glicose ou óleo bruto na concentração de 2% (v/v). Os isolados permaneceram nesse meio de cultivo por 18 dias a 180 rpm e 30 °C. Após esse período, o crescimento foi avaliado pela medida de DO₆₀₀ e biomassa seca (mg mL⁻¹). Adicionalmente, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 9.690 x g e o sobrenadante livre de células transferido para um novo tubo e estocado a 4 °C, até o momento da avaliação da produção de Compostos Ativos de Superfície (CAS) (item 4.6.1). Adicionalmente, um volume de 10 mL desses pré inoculo foi centrifugado, as células foram lavadas por duas vezes com água para remoção de resíduos do meio, o pellet ressuspendido em 1 mL de água e adicionado em cadinhos de alumínio previamente pesados. Após incubação em estufa de 56 °C

até a obtenção de peso constante (cerca de 48 h), os cadinhos foram novamente pesados e a biomassa de células determinada como a diferença das massas obtidas.

4.6.1) Avaliação da atividade surfactante pela medida da tensão superficial

Para a avaliação da produção de CAS com atividade surfactante foram utilizadas medidas de tensão superficial dos sobrenadantes das culturas. Essa tensão superficial foi determinada utilizando-se um tensiômetro Dataphysics modelo DCAT11E, equipado com placa de platina. As análises foram realizadas com os sobrenadantes à temperatura ambiente e comparadas com os valores de tensão superficial do meio mineral mínimo líquido. Os valores de tensão superficial foram expressos em mN m^{-1} .

4.6.2) Medida da atividade surfactante pelo teste do espalhamento da gota

Para a avaliação da produção de CAS com atividade surfactante foi utilizado também o teste do espalhamento da gota com os sobrenadantes das culturas. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Morita e colaboradores (2007), com modificações. Sete alíquotas de 10 μL de cada sobrenadante da cultura livre de células foram transferidas para a superfície interna de placas de poliestireno (90 X 10 mm), posicionadas sobre um papel milimetrado. Após 2 min de repouso à temperatura ambiente, as placas foram fotografadas com câmera digital e o diâmetro das gotas medido posteriormente no monitor, utilizando o papel milimetrado no fundo como referência. O controle negativo consistiu de meio de cultura estéril.

4.6.3) Método da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi realizada pelo método do índice de emulsificação (E_{24}), conforme descrito por Cameron e colaboradores (1988), com modificações. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a tubos e acrescidos de 1,5 mL de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador de tubo tipo vortex, em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice E_{24} foi determinado pela Equação 2. Inicialmente foi medida a altura da camada emulsionada (cm), que foi dividida pela altura da camada total do líquido. O valor obtido foi multiplicado por 100.

$$E_{24} = \frac{\text{Altura da camada emulsionada}}{\text{Altura total do líquido}} \times 100\%$$

Equação 2: Equação para determinação do índice de emulsificação (E_{24}) expresso em porcentagem.

4.7) Avaliação da produção das enzimas degradativas de hidrocarbonetos: catecol dioxigenases e alceno hidroxilases

Os isolados que apresentaram crescimento no óleo bruto ($DO_{600} > 0,4$) foram avaliados quanto à capacidade de produção das enzimas degradativas, catecol 1,2 e 2,3-dioxigenases, indicativas da presença das vias de orto e meta clivagem do catecol, respectivamente e de alceno hidroxilases.

4.7.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol por testes colorimétricos

A presença das enzimas catecol 1,2 e 2,3-dioxigenases foi detectada por meio de testes colorimétricos para determinação de produtos específicos das vias de clivagem catalisadas por essas enzimas, respectivamente, o β -cetoadipato e o 2-hidroximucônico semialdeído. Adicionalmente, para os isolados que demonstraram a presença dessas enzimas foram realizados ensaios enzimáticos para a quantificação de sua atividade.

Inóculos dos isolados padronizados, como descrito anteriormente (item 4.6), para uma DO_{600} de 0,5, foram cultivados em frascos de penicilina contendo 40 mL de meio BHI adicionado de fenol na concentração de 2 mmol L⁻¹ à 37 °C e agitação de 180 rpm por 24 h. Após avaliação do crescimento desses isolados por meio da leitura de DO_{600} , as células foram precipitadas por centrifugação a 23500 x g por 10 min, lavadas com solução salina estéril duas vezes (0,85%) e utilizadas em ensaios para indução das vias. As células foram ressuspensas em 20 mL de meio MMB adicionado de fenol a uma concentração de 2 mmol L⁻¹ e incubadas por aproximadamente 8 horas a 37 °C e agitação de 180 rpm. Após esse período, as células foram novamente sedimentadas por centrifugação, lavadas com tampão Tris-HCl (0,05 mol L⁻¹, pH 7,6) e utilizadas nos ensaios para determinação da via

degradativa do catecol, conforme procedimentos descritos por Hammann & Kutzner (1998), com modificações. Para tal, uma parte das células foi adicionada a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹, pH 8,0), 0,3 mL de tolueno e 1,5 mL de catecol a 9 mmol L⁻¹, os quais foram agitados vigorosamente e incubados a 28 °C. No caso de meta-clivagem do substrato, uma cor amarela se formava dentro de 15 a 60 min devido ao acúmulo do ácido 2-hidroximucônico semialdeído. Quando a cor amarela não era observada, os tubos eram incubados por 12 h e então testados quanto à presença de β-cetoadipato pela reação de Rothera (STAINER *et al.*, 1966), que consistia na adição de 1 g de uma mistura seca constituída de 60 g de (NH₄)₂SO₄ e 0,6 g de nitroprussiato de sódio, além de 0,5 mL de uma solução de amônia (33% p/v) aos tubos de ensaio. A formação de uma coloração roxa indicava a presença de β-cetoadipato, indicativo da presença da via de orto-clivagem.

Adicionalmente, era avaliada a atividade dessas enzimas para os isolados nos quais a presença das mesmas foi detectada pelos testes colorimétricos. Os extratos celulares foram obtidos sonicando-se as células por 10 min usando um sonicador Unique modelo 1650A com potencia de 12 kHz (SYLWIA *et al.*, 2009), seguido da adição de uma espátula de esferas de vidro às mesmas e agitação em agitador de tubos tipo vórtex por 3 min. As células rompidas foram removidas por centrifugação a 23500 x g por 10 min a 4 °C e os extratos mantidos em banho de gelo durante a utilização. A mistura de reação consistia de 2,0 mL de tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹ pH 7,6), 0,9 mL de catecol (2 mmol L⁻¹) e 100 μL de extrato celular (MONTEIRO, 2005). A atividade de catecol 1,2-dioxigenase foi determinada pela medida da taxa de formação de cis,cis-muconato como descrito por Varga e Neujahr (1970). A oxidação de 0,1 μmol de catecol a ácido cis-cis-mucônico resulta em um acréscimo de 0,56 unidade na densidade ótica a 260 nm e uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mol do produto por minuto.

4.7.2) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol pela detecção dos genes responsáveis pela codificação das enzimas

A presença de vias de clivagem do catecol nos isolados foi determinada pela presença dos genes responsáveis pela codificação das enzimas catecol 1,2 e 2,3-dioxigenases. A presença desses genes foi avaliada por meio da realização de reações de polimerase em cadeia (PCR), a partir do DNA extraído dos isolados,

utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes responsáveis pela codificação das enzimas catecol 1,2-dioxigenase C12OF (5'-GCCAACGTCGACGTCTGGCA-3') e C12OR (5'-CGCCTTCAAAGTTGATCTGCGTGGT-3) e catecol 2,3-dioxigenase C23OF (5'-AAGAGGCATGGGGGCGCACCCGGTTCGATCA-3') e C23OR (5'-CCAGCAAACAC CTCGTTGCGGTTGCC-3'). (SEI *et al.*, 1999). A reação de 25 μL era constituída de 5 μL de Taq Buffer IVB (5X), 1 μL de dNTP (10 mmol L^{-1} de cada), 1,0 μL dos oligonucleotídeos iniciadores (10 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$), 0,25 μL de Taq DNA polimerase (5 U μL^{-1}) (Phoneutria) e 1 μL de DNA (90-120 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). A amplificação foi realizada utilizando o termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min. A temperatura de anelamento foi de 59 °C nos primeiros 10 ciclos, 57 °C nos 15 ciclos seguintes e 55 °C nos últimos 10 ciclos (KASUGA *et al.*, 2007). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% com a utilização de um padrão de DNA ladder 1Kb e as imagens captadas e digitalizadas em fotodocumentador Alphalmager HP.

4.7.3) Determinação da produção de enzimas alceno hidroxilases

Os genes responsáveis pela codificação das enzimas alceno hidroxilases são classificados em três grupos baseados em análises filogenéticas. Nesse trabalho optou-se por avaliar a presença de genes dos grupos II e III, respectivamente alk-M e alk-B genes. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores alk-2F (5'-GAGACAAATCGTCTAAAACGTAA-3') e alk-2R (5'- TTGTTATTATTCCAATA TGCTC-3') para o grupo II e alk-3F (5'-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3') e alk-3R (5'-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3') para o grupo III. (KOHNO *et al.*, 2002). A reação de 25 μL era constituída de 5 μL de Taq Buffer IVB (5X), 1 μL de dNTP (10 mmol L^{-1} de cada), 1,0 μL dos oligonucleotídeos iniciadores (10 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$), 0,25 μL de Taq DNA polimerase (5U μL^{-1}) (Phoneutria) e 1 μL de DNA (90-120 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). A reação foi conduzida em termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento inicial a 54 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg, seguido por uma extensão final a 72 °C por 5 min (CAPELLO *et al.*, 2012). Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% com a

utilização de um padrão de DNA ladder 1Kb e as imagens captadas e digitalizadas em fotodocumentador Alphamager HP.

4.8) Avaliação da produção das enzimas esterases, lipases, hipóxido hidrolases e monooxigenases pela técnica de triagem de alto desempenho (HTS)

Os isolados que apresentaram crescimento no óleo bruto ($DO_{600} > 0,4$) também foram avaliados quanto à capacidade de produção das hidrolases: esterases, lipases, epóxido hidrolases e de enzimas monooxigenases (Baeyer-Villigers), através da técnica de triagem de alto desempenho (HTS). Os ensaios foram conduzidos no laboratório de biossíntese (LaBioSin), coordenado pela Dra Anita J Marsaioli (UNICAMP), com a utilização de sondas fluorogênicas para detecção da atividade dessas enzimas, as quais foram fornecidas por esse grupo de pesquisa. Os ensaios foram conduzidos em microplacas. Inicialmente, as bactérias avaliadas foram ativadas através do repique em meio BHI sólido e incubação por 16 h a 37 °C. Após o crescimento, as colônias que se desenvolveram foram transferidas para um tubo de microcentrífuga estéril, pesadas, ressuspendidas em 1 mL de tampão borato (20 mmol L⁻¹, pH 7,4) e posteriormente diluídas de modo a se obter uma concentração final de 0,2 mg mL⁻¹ de células nos ensaios. Para a realização dos mesmos, foram adicionados aos poços da microplaca 0,1 mL da suspensão celular produzida, 0,01 mL (2 mmol L⁻¹), das sondas fluorogênicas específicas para a atividade de cada uma das enzimas anteriormente mencionadas, 0,08 mL de BSA (5 mg mL⁻¹), e 0,01 mL de periodato de sódio (NaIO₄, 20 mmol L⁻¹). No controle positivo e negativo as amostras foram preparadas de modo similar, mas no controle positivo substituiu-se o volume correspondente das sondas fluorogênicas pelos produtos de hidrólise ou oxidação de cada uma delas e no controle negativo o volume correspondente de suspensão celular por tampão borato (20 mmol L⁻¹, pH 7,4). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e as medidas de fluorescência foram avaliadas em espectrofotômetro de fluorescência a 460 nm. As leituras foram realizadas a cada 24 h por um período de 72 h. Todos os resultados foram expressos como porcentagem de conversão da sonda no produto $P(\%)$, sendo considerado como 100% o controle positivo (reação na presença do produto de hidrólise ou oxidação da sonda) (CP). As intensidades de fluorescência obtidas nos ensaios (E) foram diminuídas dos respectivos controles negativo (CM), para os cálculos das conversões (Equação 3).

Erro! Fonte de referência não encontrada.=Erro! Fonte de referência não encontrada.

Equação 3: Equação para calcular a conversão das sondas nos produtos de hidrólise ou oxidação expressas em %

4.9) Produção e caracterização dos Compostos Ativos de Superfície produzidos pelas bactérias selecionadas

Os isolados que apresentaram os melhores resultados de redução da tensão superficial foram avaliados quanto à produção de CAS, os quais foram extraídos, quantificados, e, parcialmente caracterizados quanto à capacidade de formar emulsões estáveis com diferentes substratos hidrofóbicos.

4.9.1) Extração alcoólica dos Compostos Ativos de Superfície

Os isolados selecionados foram inicialmente ativados em meio BHI sólido e, após o crescimento, uma alçada de células foi adicionada em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio BHI. Após 24 h, esse pré-inóculo foi padronizado como descrito no item 4.6 e adicionado à frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral suplementado com glicose a 2% (v/v). Os isolados permaneceram nesse meio por 7 dias a 180 rpm e 30 °C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 7200 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante submetido ao processo de extração alcoólica (CAMARGO-DE-MORAIS *et al.*, 2003). Para tal, ao volume de sobrenadante obtido foi adicionado 4 volumes de etanol gelado e a mistura foi mantida estaticamente a 4 °C por 72 h. Após esse período, os precipitados obtidos foram recuperados por centrifugação a 7200 x g por 25 min a 4 °C, sendo posteriormente secos em estufa a 30 °C, pesados para cálculo de rendimento e armazenados a -20 °C.

4.9.2) Caracterização parcial da composição química dos Compostos Ativos de Superfície

Os CAS obtidos foram parcialmente caracterizados quanto à sua concentração de proteínas, pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951); concentração de carboidratos

totais pelo método colorimétrico de fenol sulfúrico, utilizando glicose como padrão (DUBOIS, 1951) e a concentração de lipídeos pelo método de extração a frio de Bligh & Dyer (1959), que mensura por gravimetria a concentração dos lipídeos.

4.9.3) Determinação da capacidade de formar emulsões estáveis em diferentes fases orgânicas

Os ensaios foram realizados utilizando-se uma solução dos CAS em água deionizada na concentração de 5 mg mL⁻¹. No controle negativo, somente a água deionizada foi utilizada. Alíquotas de 1 mL das soluções foram transferidas para tubos e acrescidos de 1,5 mL dos seguintes substratos hidrofóbicos: hexadecano (VETEC), hexano (VETEC), óleo diesel (Petrobras, Brasil), óleo lubrificante, querosene, xileno e tolueno (VETEC). A atividade emulsificante foi determinada utilizando a metodologia descrita no item 4.6.3 e o índice de emulsificação (E₂₄) calculado utilizando-se a equação 2.

4.10) Avaliação da biodegradação do óleo bruto em sistema de batelada

Alguns isolados que apresentaram resultados satisfatórios quanto ao crescimento em óleo bruto (DO₆₀₀>0,4) e/ou presença de enzimas degradativas e produção de CAS, foram quantificados quanto à eficácia de degradação desse substrato. Inicialmente, os isolados foram crescidos novamente em 20 mL de meio mineral suplementado com óleo bruto na concentração de 1% (v/v), como descrito no item 4.6. Após 18 dias de incubação a 180 rpm e 30 °C a remoção do óleo foi avaliada por gravimetria, com a metodologia descrita por Abraham & Kumari (2011), comparando-se os resultados obtidos pelos ensaios com os isolados com aqueles obtidos por controles não inoculados. A cultura foi removida do frasco com o auxílio de uma pipeta pasteur e centrifugada a 7200 x g por 10 min. O sobrenadante obtido foi separado e recolocado nos frascos de ensaios e o pellet descartado. A amostra foi então acidificada para pH <2 com a adição de ácido clorídrico (HCl) e posteriormente extraída serialmente por três vezes com n-hexano (VETEC) (na proporção de 5:1) em um funil de separação. Para tal, a amostra + hexano era agitada vigorosamente, adicionada no funil e deixada em repouso por 10 min para separação das fases. A fase aquosa, inferior, foi transferida para o frasco de ensaio e a fase de hexano + óleo na parte de cima adicionada em um frasco de rosca previamente pesado. A extração

foi repetida mais duas vezes até que todo o óleo fosse extraído e adicionado no frasco de rosca. Por fim, o hexano foi seco em capela de exaustão a temperatura ambiente, o frasco pesado novamente e a quantidade de óleo presente determinada. O cálculo da remoção total de óleo foi realizado pela equação descrita abaixo (Equação 4)

Erro! Fonte de referência não encontrada.=Erro! Fonte de referência não encontrada.

Equação 4: equação para calcular a remoção de óleo (%)

4.11) Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os valores obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando o teste F ao nível de 5%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao mesmo nível de 5% de significância utilizando o programa SISVAR.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene

Para a amostra de efluente oleoso determinou-se, pelo número mais provável (NMP mL⁻¹) em microplaca, a densidade de bactérias heterotróficas totais com utilização do meio BHI e a densidade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, querosene e parafina com a utilização de MMB suplementado com cada um desses combustíveis como única fonte de carbono.

A densidade de bactérias heterotróficas totais foi de $9,33 \times 10^6$ NMP mL⁻¹ e a densidade das populações de bactérias degradadoras de óleo lubrificante, querosene e parafina diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), atingindo valores de $1,66 \times 10^5$, $1,19 \times 10^4$ e $6,38 \times 10^3$, respectivamente (Figura 6). Quando comparadas com o valor de densidade de bactérias heterotróficas totais, observa-se que a população degradadora de óleo lubrificante representou as maiores porcentagens em relação à população total (1,77%), seguida da população de bactérias degradadoras de querosene (0,127%) e por fim, de parafina (0,068%).

Desde que foi proposto pela primeira vez por WRENN & VENOSA (1996), muitos trabalhos tem relatado a quantificação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos a partir da técnica de NMP em microplacas (ERIKSSON *et al.*, 2001; RUGGERI *et al.*, 2009; BENEDEK *et al.*, 2011; CERQUEIRA *et al.*, 2012). A escolha do uso dos combustíveis óleo lubrificante, parafina e querosene para avaliação do perfil e potencial degradativo da população foi devido ao fato de que os mesmos, em conjunto, apresentam em sua composição uma grande variedade de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, com cadeias carbônicas de diferentes tamanhos.

O óleo lubrificante é uma fração do petróleo de peso médio. É formado principalmente por hidrocarbonetos de 26 a 38 átomos de carbono, essencialmente os parafínicos e naftênicos, podendo conter quantidades menores de aromáticos e mais raramente oleofínicos (KOLESNIKOVAS *et al.*, 2009). O querosene é um material de peso leve que contém hidrocarbonetos com 10 a 16 átomos de carbono, com predominância das parafinas, cicloparafinas, aromáticos e oleofinas (DAGAUT & CATHONNET, 2006). As parafinas são obtidas pelo refino do óleo lubrificante e são compostas essencialmente por uma mistura de hidrocarbonetos com massa molar

elevada, geralmente com mais de 20 átomos de carbono, organizados em cadeias abertas, lineares ou ramificadas (THOMAS, 2001).

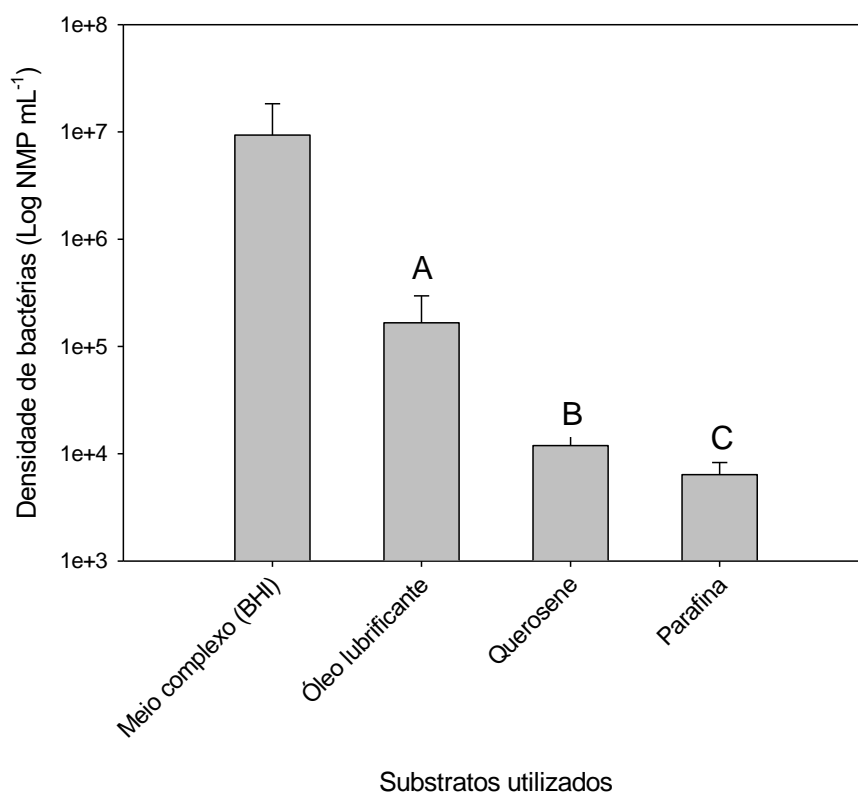


Figura 6: Densidade da população de bactérias heterotróficas totais e da população bacteriana degradadora dos hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, querosene e parafina, determinadas pela técnica de NMP. Barras indicam os valores de desvio padrão. As médias com letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A observação de diferenças nas populações das bactérias degradadoras dos diferentes combustíveis, expressa pelo índice NMP mL⁻¹ que considera o número de poços com crescimento para as diluições usadas, e, ainda, nos valores de crescimento de poços adicionados de diferentes combustíveis, mas inoculados com a mesma diluição da amostra (dados não mostrados), indica que a suscetibilidade desses diferentes hidrocarbonetos à degradação microbiana foi variável. Isto pode estar relacionado à sua estrutura, estado físico e toxicidade. De forma geral, as frações contendo n-alcanos são mais susceptíveis à biodegradação, enquanto as frações contendo alcanos ramificados e as frações aromáticas são mais recalcitrantes, pois a recalcitrância e consequente persistência de um composto

aumenta à medida que o tamanho e peso da molécula aumentam, assim como o número de ramificações, de anéis aromáticos e substituintes halogênicos (WILSON *et al.*, 1986; WETLER-TONINI *et al.*, 2010). Entretanto, o fator mais relevante a ser considerado é a composição da comunidade microbiana da amostra, pois sabe-se que há micro-organismos que degradam preferencialmente alcanos alifáticos, ramificados e cíclicos, os que degradam aromáticos e ainda aqueles que degradam ambos (ATLAS, 1995).

5.2) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana cultivável total das amostras utilizando o sistema Biolog-ECOPLATE.

A diversidade metabólica da comunidade microbiana presente na amostra de efluente oleoso foi determinada com a utilização do sistema Biolog-ECOPLATE, que permite mensurar o consumo, ao longo do tempo, de 31 diferentes fontes de carbono agrupadas em seis grandes grupos de compostos (carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, amidas/aminas, aminoácidos e ácidos carboxílicos), de acordo com Choi & Bobbs (1999) (Anexo 1).

Pôde-se observar que a velocidade de utilização dos grupos de compostos foi variável (Figura 7). As fases lineares dos gráficos de consumo de cada grupo de compostos representam o período de atividade metabólica da comunidade nos grupos de substratos específicos e o platô, o ponto onde ocorreu consumo máximo dos mesmos (KONOPKA *et al.*, 1998). Nos ensaios, a velocidade de consumo de todos os grupos, com exceção dos fenólicos, foi maior nas primeiras 48 horas de incubação, tendendo a estabilização após esse período (Figura 7), o que demonstra que os substratos foram consumidos rapidamente.

A velocidade de utilização de cada um dos grupos de compostos foi determinada pelo cálculo do coeficiente angular da fase linear dos gráficos gerados pelos dados de consumo dos mesmos. O perfil observado está apresentado na tabela 2, sendo a velocidade de utilização de carboidratos > aminoácidos > polímeros > ácidos carboxílicos > aminas/amidas > compostos fenólicos.

Esta diversidade metabólica pode estar relacionada com a composição da amostra, também diversa. De forma geral, resíduos e efluentes industriais contaminados com compostos oleosos possuem diversidade e alta concentração de compostos orgânicos não tóxicos, óleo livre, compostos fenólicos, substâncias

pécticas, hidrocarbonetos alifáticos e poliaromáticos livres ou emulsionados, além de sais inorgânicos (KOKOSSIS *et al.*, 2007). Os compostos orgânicos não tóxicos, que são mais prontamente disponíveis por serem direcionados diretamente para as vias principais, foram consumidos rapidamente e de forma mais expressiva. Já os compostos fenólicos, muitos dos quais tóxicos e degradados somente por uma porção da comunidade após a indução de vias específicas, foram metabolizados também, porém de forma mais tardia.

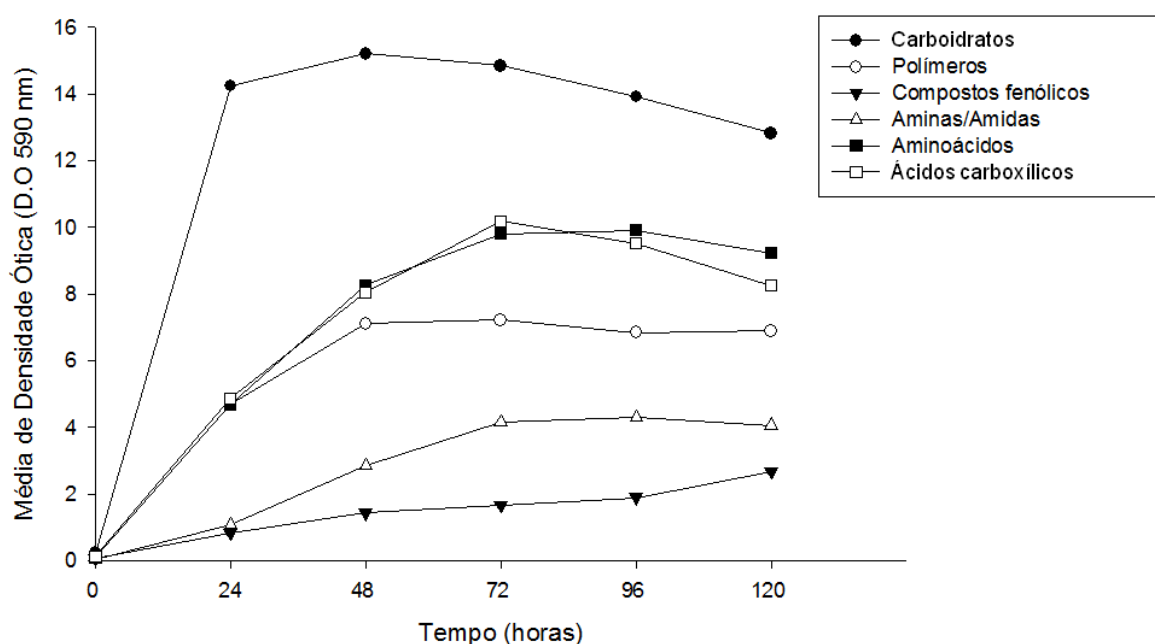


Figura 7: Média da Densidade ótica a 590 nm dos grupos de compostos carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, aminas/amidas, aminoácidos e ácidos acéticos carboxílicos em função do tempo de avaliação expressos em horas.

Tabela 2: Valor do coeficiente angular e de R^2 (coeficiente de determinação) das equações das retas obtidas pelas plotagens dos valores de densidade ótica a 590 nm de cada um dos grupos de compostos em função do tempo

| Grupo de Compostos | Coeficiente Angular | R^2 |
|---------------------|---------------------|-------|
| Carboidratos | 14,01 | 1 |
| Aminoácidos | 4,068 | 0,994 |
| Polímeros | 3,496 | 0,969 |
| Ácidos carboxílicos | 3,335 | 0,97 |
| Aminas/Amidas | 1,411 | 0,99 |
| Compostos fenólicos | 0,47 | 0,958 |

Ressalta-se que individualmente todos os 31 substratos foram utilizados pela comunidade microbiana, com exceção do 2-Hidroxy ácido benzoico, que é um composto fenólico. O substrato que apresentou o maior consumo foi a feniletilamina, que é uma amina (dados não apresentados). O consumo desse grande número de substratos demonstra uma alta diversidade e potencial metabólico da comunidade, já que o número de substratos oxidados decresce em comunidades com baixa diversidade (CRAVO-LEURAU *et al.*, 2011).

O perfil de consumo de substratos apresentado pela comunidade bacteriana da amostra é semelhante ao perfil obtido por outros trabalhos com amostras oleosas. Eusébio e colaboradores (2011), analisando o perfil metabólico da comunidade microbiana presente em efluentes oleosos provenientes de uma indústria de azeites, também observaram que o grupo de compostos mais utilizados foram os carboidratos, seguidos dos ácidos carboxílicos e, também não houve a utilização do 2-hidroxy ácido benzóico.

Ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo possuem uma microbiota modificada em relação aos mesmos ambientes em condições normais, e embora saiba-se a importância do papel dessa microbiota na remoção dos poluentes, ainda há poucas informações sobre sua estrutura, diversidade e funcionalidade metabólica, que também são alteradas nessas condições (GOMEZ *et al.*, 2004; CRAVO-LEURAU *et al.*, 2011). Isso ocorre porque a maioria dos estudos da microbiota relacionada à degradação de hidrocarbonetos envolve métodos que se baseiam no isolamento e posterior estudo dos micro-organismos. Entretanto, devido à natureza seletiva do processo uma minoria deles acaba sendo selecionada (SCHNEIDER *et al.*, 1998; CRAVO-LEURAU *et al.*, 2011).

Assim, apesar da importância do isolamento e identificação desses micro-organismos para uso posterior, ensaios como o Biolog-ECOPLATE, que de forma simples e rápida permitem a obtenção da diversidade e perfil metabólico-funcional da comunidade microbiana desses ambientes, fornecem uma informação mais sensível e ecológica sobre a estrutura e funcionamento da mesma, caracterizando-a (GARLAND & MILLS, 1991; LISS *et al.*, 1996; LEGGE *et al.*, 2007; CRAVO-LEURAU *et al.*, 2011). Isso fez com que esses ensaios ganhassem muito destaque em estudos ecológicos e ambientais (KONOPKA *et al.*, 1998).

Entretanto, resultados obtidos por ensaios desse tipo devem ser interpretados com algumas ressalvas, pois a técnica ainda possui limitações. Uma delas é o fato de que as diferentes fontes de carbono nas microplacas Biolog-ECOPATE não abrangem toda a gama de substratos orgânicos de crescimento presentes em ambientes naturais, o que limita a caracterização e aplicação tecnológica dos isolados obtidos (KONOPKA *et al.*, 1998). Outra é o fato de ocorrer uma alteração da estrutura da comunidade original em cada poço, já que há também um crescimento diferenciado dos micro-organismos nos mesmos ao longo do período de incubação (GUCKERT *et al.*, 1996). Além disso, a utilização de um método dependente de cultivo para avaliar a diversidade microbiana tem limitações, pois não inclui o estudo dos micro-organismos não cultiváveis (ZHANG & XU, 2008).

5.3) Isolados bacterianos cultiváveis obtidos por meio do plaqueamento direto do efluente oleoso, plaqueamento de alíquotas das microplacas e pelo método de enriquecimento

Para os ensaios de prospecção enzimática e da produção de CAS foram avaliados isolados obtidos a partir do plaqueamento direto do efluente oleoso, plaqueamento de alíquotas dos poços com crescimento do ensaio de determinação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos pela técnica do NMP e da técnica de enriquecimento em meio mineral ou BHI suplementados com óleo bruto ou óleo recuperado da ETEI.

Foi obtido um total de 112 isolados morfológicamente distintos: 15 isolados pelo plaqueamento direto; 29 isolados pelo plaqueamento de alíquotas das microplacas suplementadas com combustíveis (10 pelo óleo lubrificante, 13 pela parafina e 6 pelo querosene) e 68 isolados pelo plaqueamento das amostras submetidas ao enriquecimento (26 pelo enriquecimento em meio mineral suplementado com petróleo bruto, 14 pelo enriquecimento em meio mineral suplementado com óleo recuperado, 22 pelo enriquecimento em meio BHI suplementado com óleo bruto e 6 pelo enriquecimento em meio BHI suplementado com óleo recuperado) (Anexo 2).

Ao longo das etapas de isolamento, foi observada a ocorrência do mesmo morfotipo nas placas provenientes dos diferentes métodos e combustíveis utilizados, mais somente um único representante de cada foi selecionado. Determinou-se a densidade (UFC mL⁻¹) e a caracterização dos diferentes isolados, considerando-se

algumas características da colônia como a cor, cremosidade (cremosa/opaca), rugosidade (lisa/rugosa) e aspecto da borda (regula/irregular). A coloração de Gram foi realizada para verificar a pureza dos isolados e caracterizá-los quanto à morfologia celular e o tipo de reatividade a essa coloração (Anexo 2).

A densidade de colônias dos isolados obtidos pelos três métodos de isolamento foi variável. Pelo plaqueamento direto da amostra a densidade dos isolados variou de 2×10^2 a 3×10^4 UFC mL⁻¹, pelo plaqueamento de alíquotas das microplacas de $2,5 \times 10^5$ a $5,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e pelo enriquecimento de 1×10^4 a $2,1 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (Anexo 2).

De forma geral, houve a predominância de bactérias Gram positivos, que corresponderam a aproximadamente 67% do total (75 isolados), enquanto os Gram negativos corresponderam a aproximadamente 33% (37 isolados). Tanto pelo plaqueamento direto quanto pelo enriquecimento o número de isolados Gram positivos foi muito superior aos Gram negativos (12 Gram positivos e 3 Gram negativos pelo plaqueamento direto e 51 Gram positivos e 17 Gram negativos pelo enriquecimento). No plaqueamento de alíquotas das microplacas, o número de isolados Gram positivos e negativos se aproximou, sendo observados 17 Gram negativos e 12 Gram positivos (Anexo 2).

Houve também a predominância de isolados bacterianos com forma de bastonete, que corresponderam a 75% do total (84 isolados) seguido pelos morfotipos com forma de cocos que corresponderam a aproximadamente 17% (19 isolados) e em menor quantidade pelos isolados com forma de cocobacilo, que representaram aproximadamente 8% (9 isolados). Pelo plaqueamento direto só foram obtidos isolados com forma de bastonetes e cocos (11 bastonetes e 4 cocos). Pelo plaqueamento de alíquotas das microplacas, foram obtidos 21 bastonetes, 6 cocos e 2 cocobacilos e pelo enriquecimento 52 bastonetes 9 cocos e 7 cocobacilos (Anexo 2).

Trabalhos que estudam a diversidade ou isolamento de micro-organismos a partir de ambientes contaminados revelam a presença de uma grande diversidade de bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas. A maioria desses trabalhos tem relatado uma predominância de bactérias gram negativas (MORELLI *et al.*, 2005; MOUNTEER *et al.*, 2006; KABELITZ *et al.*, 2009), mas também há trabalhos que relataram a predominância de bactérias Gram positivas. Vasileva-Tonkova e colaboradores (2008) avaliando a diversidade e caracterização morfo-fisiológica de

bactérias isoladas de efluentes industriais contaminados com hidrocarbonetos, que se mostraram capazes de crescer em meio suplementado com diferentes combustíveis, constataram que a maioria desses isolados (60%) eram Gram positivos.

O método de isolamento e a fonte de carbono que permitiram a obtenção do maior número de isolados foram, de modo geral, o método com utilização do enriquecimento e o combustível óleo bruto. O enriquecimento é comumente empregado para a seleção de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, utilizando-se meios de culturas adicionados de diferentes combustíveis, e seu uso já foi relatado em muitos trabalhos (RAHMAN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2005; RUGGERI *et al.*, 2009; MALIK & AHMED., 2012). Esse método de seleção se baseia no fato de que comunidades microbianas de ambientes contaminados com derivados de petróleo se adaptam, devido à pressão natural decorrente de adições sucessivas de hidrocarbonetos, adquirindo resistência aos contaminantes e também o aparato enzimático necessário para a sua degradação e utilização como fonte de carbono e energia. Essas adaptações ocorrem pela indução e/ou desrepressão de enzimas específicas ou mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas (ROSATO, 1997). Como consequência, essas comunidades microbianas tem uma proporção maior de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos que podem responder a presença dos contaminantes (OKERENTUGBA & EZERONYE., 2003) e estas têm o seu crescimento favorecido, ficando o meio de cultura utilizado na técnica enriquecido destas populações.

O isolamento a partir do plaqueamento de alíquotas dos poços com crescimento positivo nas microplacas contendo meio mineral suplementado com óleo lubrificante, parafina ou querosene, de certa forma, também foi um método de enriquecimento. Optou-se por realiza-lo pelo fato de as bactérias presentes nesses meios terem sido capazes de crescer e permanecer por um período de incubação superior a 14 dias tendo esses combustíveis como únicas fontes de carbono, o que indicava que elas eram potencialmente capazes de degradar hidrocarbonetos presentes nos mesmos.

Kostka e colaboradores (2011) conseguiram isolar bactérias aptas a degradar hidrocarbonetos de petróleo a partir de amostras de água marinha contaminada por derramamentos de óleo no golfo do México. O isolamento foi feito pelo enriquecimento das amostras em meio mineral suplementado com óleo e também a partir do plaqueamento de alíquotas de microplacas utilizadas em ensaios para

detecção do NMP mL⁻¹ de bactérias degradadoras de óleo. Gudna e colaboradores (2012), com o objetivo de isolar bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo a partir de amostras obtidas de reservatórios de combustíveis, também utilizaram duas técnicas de isolamento, o plaqueamento direto e a técnica de enriquecimento em meio mineral suplementado com hexadecano. Eles não conseguiram obter nenhum isolado com a capacidade de degradar o óleo pelo plaqueamento direto, somente pelo enriquecimento.

5.4) Identificação dos isolados bacterianos

Após a extração de DNA das células bacterianas, a amplificação de regiões do gene do rRNA 16S foi realizada com sucesso para todos os isolados empregando-se os iniciadores 8f e 907r. Na análise por eletroforese em gel de agarose 1% foi observado que o produto de PCR de todos os isolados apresentou o tamanho de banda esperado, aproximadamente 900 pares de bases. Os produtos das reações de PCRs foram purificados e submetidos à técnica de sequenciamento com o objetivo de se identificar as espécies ou gênero dos isolado por meio da comparação das sequências obtidas com aquelas depositadas no Genbank.

Dos 112 isolados, foi possível identificar 88 (aproximadamente 79%), sendo a maioria só ao nível de gênero. O isolado LAPEO 104 só pôde ser identificado ao nível de grupo e o isolado LAPEO 115 só ao nível de família. Muitos isolados após adição das sequências no Genbank foram caracterizados como bactérias não cultiváveis (LAPT 1, LAPT 12, LAPM 29, LAPM 38, LAPM 48, LAPER 56, LAPER 58, LAPER 62, LAPER 71 e LAPER 85) e podem representar novas espécies ainda não isoladas em cultura pura ou espécies conhecidas cujas sequências ainda não foram depositadas no banco de dados (PROSSER *et al.*, 1999). Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Ao todo foram identificados 16 gêneros diferentes na comunidade bacteriana: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Shewanella* (gama proteobacteria); *Alcaligenes*, *Kerteszia* (beta proteobacteria); *Ochrobactrum* (alfa proteobacteria); *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* (Firmicutes); *Leocobacter*, *Rhodococcus* (Actinobactéria); *Stenotrophomonas* e *Chryseobacterium* (Flavobacteria).

Tabela 3. Identificação dos isolados por meio da comparação de sequências obtidas da região 16S com sequências depositadas no GenBank

| Método do isolamento | Isolado | Identificação | Score | ID (%) |
|---|-------------------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| Plaqueamento direto | LAPT 01 | Uncultured bacterium | 1053 | 99% |
| | LAPT 03 | <i>Rhodococcus sp.</i> | 1275 | 100% |
| | LAPT 04 | <i>Enterobacter sp.</i> | 616 | 93% |
| | LAPT 05 | <i>Staphylococcus sp.</i> | 1639 | 100% |
| | LAPT 06 | <i>Leucobacter sp.</i> | 1142 | 99% |
| | LAPT 07 | <i>Bacillus sp.</i> | 1408 | 100% |
| | LAPT 09 | <i>Bacillus sp.</i> | 1463 | 100% |
| | LAPT 12 | Uncultured bacterium | 1212 | 100% |
| | LAPT 15 | <i>Enterobacter sp.</i> | 1258 | 99% |
| | LAPT 20 | <i>Bacillus licheniformis</i> | 1640 | 100% |
| | LAPT 21 | <i>Bacillus sp.</i> | 1074 | 100% |
| | LAPT 22 | <i>Bacillus sp.</i> | 1637 | 99% |
| Plaqueamento de alíquotas das microplacas | LAPM 23 | <i>Bacillus sp.</i> | 1648 | 100% |
| | LAPM 24 | <i>Enterobacter sp.</i> | 610 | 100% |
| | LAPM 27 | <i>Stenotrophomonas sp.</i> | 1428 | 100% |
| | LAPM 28 | <i>Ochrobactrum intermedium</i> | 1480 | 99% |
| | LAPM 29 | Uncultured bacterium | 1260 | 99% |
| | LAPM 30 | <i>Acinetobacter junii</i> | 918 | 99% |
| | LAPM 31 | <i>Escherichia coli</i> | 1615 | 100% |
| | LAPM 33 | <i>Staphylococcus sp.</i> | 1528 | 99% |
| | LAPM 34 | <i>Chryseobacterium joostei</i> | 1522 | 99% |
| | LAPM 36 | <i>Klebsiella sp.</i> | 1223 | 99% |
| | LAPM 38 | Uncultured bacterium | 1615 | 100% |
| | LAPM 39 | <i>Bacillus sp.</i> | 1635 | 100% |
| | LAPM 40 | <i>Enterobacter sp.</i> | 1544 | 99% |
| | LAPM 41 | <i>Acinetobacter junii</i> | 966 | 100% |
| | LAPM 43 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1437 | 100% |
| | LAPM 48 | Uncultured bacterium | 1242 | 100% |
| | LAPM 49 | <i>Bacillus sp.</i> | 1611 | 100% |
| LAPM 50 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 1323 | 99% | |
| LAPM 52 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1330 | 99% | |
| LAPM 53 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1347 | 100% | |
| Plaqueamento do enriquecimento | LAPER 54 | <i>Acinetobacter sp.</i> | 972 | 99% |
| | LAPER 56 | Uncultured bacterium | 1275 | 100% |
| | LAPER 57 | <i>Shewanella sp.</i> | 1286 | 99% |
| | LAPER 58 | Uncultured bacterium | 1308 | 100% |
| | LAPER 59 | <i>Bacillus sp.</i> | 979 | 99% |
| | LAPER 60 | <i>Alcaligenes sp.</i> | 1251 | 100% |
| | LAPER 61 | <i>Acinetobacter sp.</i> | 894 | 99% |
| | LAPER 62 | Uncultured bacterium | 1513 | 99% |
| | LAPER 66 | <i>Enterococcus sp.</i> | 1339 | 99% |
| | LAPER 67 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1463 | 99% |
| | LAPER 69 | <i>Bacillus sp.</i> | 1291 | 100% |
| LAPER 70 | <i>Bacillus sp.</i> | 1583 | 100% | |

| | | | |
|-----------|-------------------------------------|------|------|
| LAPER 71 | <i>Uncultured bacterium</i> | 1611 | 99% |
| LAPER 72 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1423 | 100% |
| LAPER 73 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1623 | 100% |
| LAPER 74 | <i>Bacillus sp.</i> | 1323 | 10% |
| LAPER 76 | <i>Bacillus sp.</i> | 1635 | 100% |
| LAPER 77 | <i>Bacillus pumilus</i> | 1648 | 99% |
| LAPER 78 | <i>Staphylococcus sp.</i> | 1628 | 99% |
| LAPER 79 | <i>Bacillus sp.</i> | 1629 | 100% |
| LAPER 80 | <i>Bacillus anthracis</i> | 1602 | 100% |
| LAPER 81 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1637 | 100% |
| LAPER 82 | <i>Bacillus sp.</i> | 1646 | 100% |
| LAPER 84 | <i>Bacillus sp.</i> | 1652 | 100% |
| LAPER 85 | <i>Uncultured Bacillus</i> | 1646 | 99% |
| LAPER 86 | <i>Bacillus sp.</i> | 1363 | 100% |
| LAPER 89 | <i>Alcaligenes sp</i> | 1188 | 99% |
| LAPER 90 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1639 | 99% |
| LAPER 91 | <i>Bacillus sp.</i> | 1256 | 100% |
| LAPER 92 | <i>Bacillus pumilus</i> | 1655 | 100% |
| LAPER 93 | <i>Bacillus subtilis</i> | 1423 | 99% |
| LAPER 94 | <i>Alcaligenes sp.</i> | 1173 | 100% |
| LAPER 95 | <i>Bacillus sp.</i> | 1659 | 100% |
| LAPEO 96 | <i>Kerstersia gyiorum</i> | 802 | 99% |
| LAPEO 97 | <i>Bacillus sp</i> | 1410 | 100% |
| LAPEO 98 | <i>Bacillus sp.</i> | 1644 | 100% |
| LAPEO 99 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1408 | 99% |
| LAPEO 100 | <i>Bacillus sp.</i> | 1437 | 99% |
| LAPEO 101 | <i>Bacillus sp.</i> | 1168 | 99% |
| LAPEO 102 | <i>Bacillus sp.</i> | 1659 | 100% |
| LAPEO 103 | <i>Bacillus sp.</i> | 1661 | 99% |
| LAPEO 104 | <i>Swine manure bacterium</i> | 1628 | 99% |
| LAPEO 105 | <i>Bacillus sp.</i> | 1626 | 100% |
| LAPEO 106 | <i>Bacillus sp.</i> | 1648 | 100% |
| LAPEO 107 | <i>Bacillus sp.</i> | 1644 | 99% |
| LAPEO 109 | <i>Ochrobactrum sp.</i> | 1208 | 100% |
| LAPEO 111 | <i>Pseudomonas putida</i> | 1351 | 100% |
| LAPEO 112 | <i>Ochrobactrum sp</i> | 1530 | 99% |
| LAPEO 113 | <i>Escherichia coli</i> | 1310 | 99% |
| LAPEO 115 | <i>Enterobacteriaceae bacterium</i> | 1000 | 98% |
| LAPEO 117 | <i>Ochrobactrum sp.</i> | 1242 | 100% |
| LAPEO 118 | <i>Enterococcus sp.</i> | 1491 | 100% |
| LAPEO 119 | <i>Acinetobacter xiamenensis</i> | 1181 | 98% |
| LAPEO 122 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1360 | 100% |
| LAPEO 123 | <i>Bacillus sp</i> | 1648 | 99% |
| LAPEO 124 | <i>Bacillus megaterium</i> | 1454 | 99% |

A composição variou consideravelmente com o tipo de seleção utilizado. Para cada um dos três métodos de isolamento foi calculada a frequência relativa dos gêneros presentes (Figura 8). Ressalta-se que as frequências relativas dos gêneros

obtidos pelo plaqueamento das alíquotas das microplacas e pelo enriquecimento devem ser interpretadas com ressalvas, levando-se em consideração que esses isolados foram obtidos a partir de métodos nos quais houve a adição de diferentes combustíveis à amostra. Dessa forma, a amostra teve sua densidade natural alterada podendo-se afirmar somente que essas são as frequências relativas dos gêneros na mesma após a pressão seletiva imposta pela adição dos combustíveis.

No isolamento por plaqueamento direto houve uma predominância dos gêneros *Enterobacter* (35,88%), *Bacillus* (30,42%), *Leucobacter* (17,94%) e *Staphylococcus* (15,60%), ocorrendo em menor proporção o gênero *Rhodococcus* (0,16%) (Figura 8 A). No isolamento a partir de alíquotas das microplacas suplementadas com os combustíveis houve uma predominância dos gêneros *Stenotrophomonas* (25,76%), *Enterobacter* (21,72%), *Klebsiella* (12,88%), *Pseudomonas* (11,67%), *Bacillus* (8,96%), *Acinetobacter* (8,66%) e *Escherichia* (6,84%), ocorrendo também de forma menos significativa a presença dos gêneros *Ochrobactrum* (2,01%), *Chryseobacterium* (1,25%) e *Staphylococcus* (0,24%) (Figura 8 B). Já no isolamento pelo método de enriquecimento houve uma predominância quase total do gênero *Bacillus* (97%), havendo uma ocorrência menor do gênero *Kerteszia* (2,5%) e a ocorrência quase insignificativa (<1%) dos gêneros *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Ochrobactrum*, *Escherichia*, *Alcaligenes* e *Shewanella*, que não puseram ser expressos graficamente (Figura 8 C).

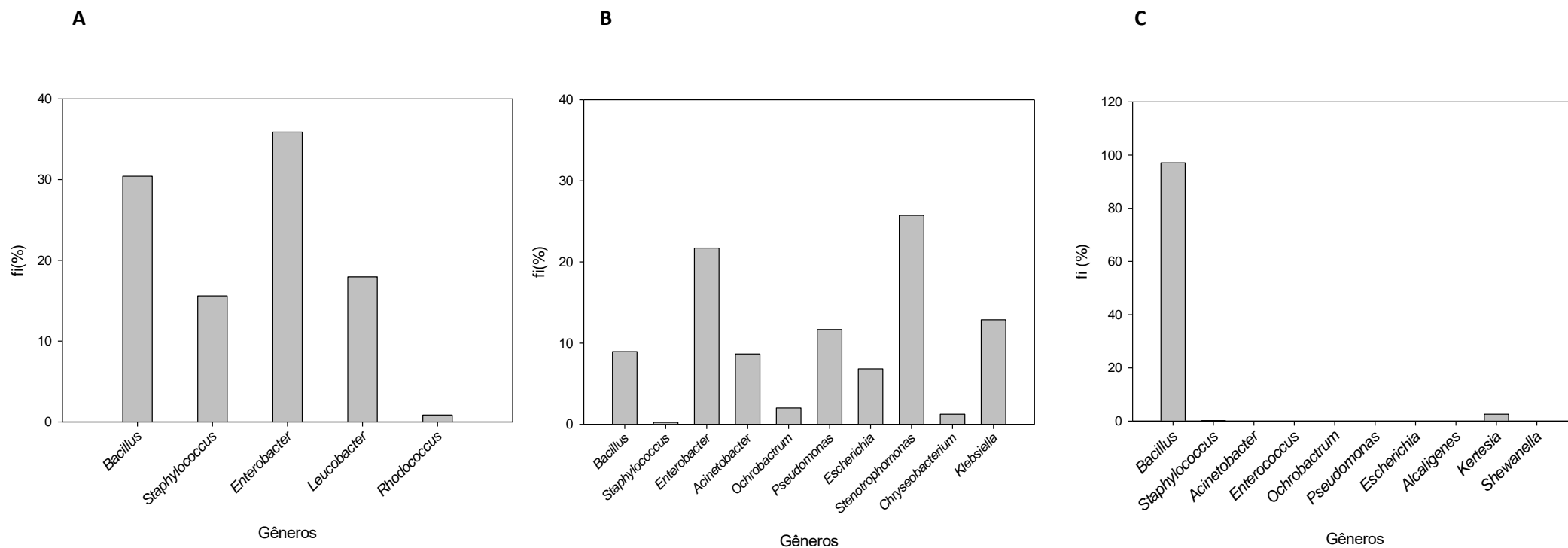


Figura 8: Frequência relativa (%) dos gêneros obtidos em cada um dos três métodos de isolamento. (A) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo plaqueamento direto. (B) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo plaqueamento de alíquotas das microplacas utilizadas nos ensaios de cálculo do NMP mL⁻¹ de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. (C) Frequência relativa dos gêneros obtidos pelo enriquecimento.

Observa-se que a diversidade de gêneros no plaqueamento direto foi bem menor que nos outros métodos. Isso pode estar relacionado ao fato de que esse método favorece os organismos dominantes na comunidade em relação aos demais (ZHUANG *et al.*, 2002). De modo geral, houve uma predominância do gênero *Bacillus sp.* e o fato de espécies desse gênero terem sido obtidas a partir do plaqueamento direto e também a abundância de seu isolamento a partir do enriquecimento evidencia sua competitividade e sugere que esse gênero desempenhe um importante papel no ambiente contaminado. Muitas espécies de *Bacillus sp.* tem a propriedade de colonizar ambientes contaminados com hidrocarbonetos (GAYLARD *et al.*, 1999). Sua ocorrência tem sido associada a amostras de solo, água e sedimentos contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo, sendo muitas vezes as espécies predominantes nesses ambientes altamente poluídos (IJAH & ANTAI, 2003; CALVO *et al.* 2004; NKWELANG *et al.*, 2008; KOTSKA *et al.*, 2011; GUDINA *et al.*, 2012). Acredita-se que um dos principais mecanismos que permite a adaptação e tolerância a níveis elevados desse contaminantes é a capacidade dos isolados desse gênero em formar endósporos, além da produção de Compostos Ativos de superfície e enzimas degradativas (ZHUANG *et al.*, 2002).

A dificuldade de separação das espécies dentro do gênero *Bacillus* utilizando a comparação de sequências do gene do rRNA 16S ocorre porque os grupos de espécies desse gênero são muito próximos filogeneticamente e indistinguíveis uns dos outros através de análise de sequências desse gene. Assim, a identificação de espécies do gênero *Bacillus* requer o uso de técnicas adicionais como o sequenciamento de regiões do gene codificador da DNA girase (Topoisomerase tipo II), análise de metil éster de ácidos graxos (FAME), hibridização DNA-DNA e testes bioquímicos (HUANG, 1996; LA DUC *et al.*, 2004; XU & CÔTÉ, 2003). Em estudo realizado por Cunha e colaboradores (2006), diversas bactérias do gênero *Bacillus* foram isoladas a partir de um reservatório de petróleo e para alguns desses isolados houve uma grande dificuldade de distinção entre a espécie *B. subtilis* e *B. lichneformis* ou entre as espécies *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thurigiensis*.

Além do gênero *Bacillus*, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* e *Stenotrophomonas* já foram isoladas de vários ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo como solo, lodo, sedimentos, água do mar, efluentes de refinarias e ainda de reservatórios de

combustíveis, após as amostras serem submetidas à enriquecimento em meio mineral suplementado com combustíveis (SÁNCHEZ *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2005; DAS *et al.*, 2007; GALLEGO *et al.*, 2007; CHOPAIDE *et al.*, 2010a; MADAMWAR *et al.*, 2012). Bactérias dos gêneros *Rhodococcus* e *Acinetobacter* já foram observadas crescendo até mesmo diretamente em gotas de óleo (VAN-HAMME *et al.*, 2003).

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* incluindo *Enterobacter cloacae* já foram isoladas diretamente a partir de óleo bruto e apresentaram elevado crescimento em meios minerais suplementados com hidrocarbonetos (CALVO *et al.*, 2006). Também bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Ochrobactrum* já foram isoladas a partir de sedimentos marinhos contaminados com petróleo e reservatórios de combustíveis (RAUCH *et al.*, 2006; CHIKERE *et al.*, 2009), lodo ativado e efluente do separador água-óleo de uma estação de tratamento de efluentes gerados por uma indústria petroquímica, além de solo contaminado com petróleo de um sistema de landfarming (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

Os gêneros *Chryseobacterium*, *Leucobacter* e *Enterococcus*, diferentemente dos demais gêneros mencionados, não são tipicamente caracterizados como gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, mas sua presença em ambientes contaminados com derivados de petróleo também já foi relatada. Bactérias do gênero *Chryseobacterium* já foram isoladas de solos contaminados com óleo bruto (OWSIANIYAK *et al.* 2009) e bactérias do gênero *Leucobacter* de amostras ambientais submetidas a enriquecimento em meio mineral suplementado com óleo lubrificante e a partir de reservatórios de combustíveis, sendo que há algumas espécies, como *L. Komgatae*, que foram caracterizadas como produtoras de compostos tensoativos (RAUCH *et al.*, 2006; SAIMAI *et al.*, 2012). O mesmo ocorre com bactérias do gênero *Enterococcus*, pois linhagens de *E. faecium* já foram isoladas de solo contaminado com creosol após a amostra ter sido submetida a enriquecimento em meio mineral contendo HPA como única fonte de carbono (MUELLER *et al.*, 1997).

Além dos gêneros mencionados anteriormente houve também uma grande ocorrência dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e em menor proporção *Kerteszia* e *Shewanella*, o que está relacionando à origem da amostra coletada. A lagoa de tratamento não tem qualquer cobertura e por isso é alvo de dejetos e diversos outros resíduos orgânicos provenientes do ar e solo do entorno e esses gêneros de bactérias estão comumente relacionados ao trato gastrointestinal de animais de sangue quente

e material fecal. Há estudos, demonstrando que essas bactérias são capazes de sobreviver e se manter ativas em ambientes aquáticos contaminados com petróleo (SANTO-DOMINGO *et al.*, 1989; CHIKERE *et al.*, 2009). Assim, é provável que elas tenham tolerado os combustíveis e permanecido na amostra, mesmo não os utilizando como fonte de carbono e energia.

De modo geral, a maior parte dos gêneros comumente relacionados à ambientes contaminados com petróleo e que são conhecidos na literatura por sua capacidade de degradação de hidrocarbonetos e utilização em processos de biorremediação foram obtidos, neste estudo, a partir dos métodos com adição de combustíveis à amostra. Isso demonstra que somente pelo plaqueamento direto das amostras, esses gêneros nem sempre podem ser isolados, muitas vezes por estarem em número reduzido, enfatizando a importância do uso da técnica de enriquecimento.

5.5) Crescimento, atividade surfactante e emulsificante dos isolados bacterianos

Todos os isolados obtidos pelos métodos de isolamento utilizados foram avaliados quanto à capacidade de crescer em glicose e óleo e bruto e de produzir CAS, pela medida da atividade emulsificante e/ou surfactante. Os resultados completos desses testes podem ser visualizados no anexo 3.

5.5.1) Crescimento dos isolados bacterianos em glicose e óleo bruto

Inicialmente foi avaliado o crescimento dos isolados nas duas fontes de carbono por meio de medidas da DO₆₀₀ e também da biomassa seca (mg mL⁻¹).

O crescimento, avaliando-se os resultados de DO₆₀₀, variou estatisticamente de acordo com o isolado e com a fonte de carbono ($p < 0,05$). De modo geral, as maiores médias de crescimento foram proporcionadas pelo cultivo em meio mineral suplementado com glicose (Anexo 4). Os isolados que apresentaram os maiores valores de densidade ótica no meio com glicose foram LAPM 44, LAPER 56, LAPEO 114, LAPEO 116, LAPEO 121, *Ochrobactrum sp.* LAPEO 112; *Alcaligenes sp.* LAPER 60 e *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27 (DO₆₀₀ > 3,1). Também houve interação estatística entre os isolados e a fonte de carbono, e por isso a influência dessas fontes foi avaliada para cada isolado e muitos apresentaram altos valores de crescimento também no meio suplementado com óleo bruto, dentre eles os que

apresentaram os maiores valores foram LAPEO 121, LAPEO 110, LAPER 58; *Ochrobactrum sp.* LAPEO 117 e LAPEO 112; *Alcaligenes sp.* LAPER 89; *Enterococcus sp.* LAPER 66 e *Alcaligenes sp.* LAPER 60, ($DO_{600} > 1,5$), sendo isolados obtidos a partir de métodos de plaqueamento nos quais a amostra foi cultivada em meio suplementados com combustíveis (Anexo 3).

O crescimento, em relação aos resultados obtidos pelos dados de biomassa, também variou estatisticamente de acordo com o isolado e com a fonte de carbono utilizada ($p < 0,05$) (Anexo 5). Considerando-se todos os resultados, de um modo geral, as maiores médias de biomassa também foram proporcionadas pelo cultivo em meio mineral suplementado com glicose. Os isolados que apresentaram os maiores valores de crescimento com essa fonte foram LAPM 44, LAPER 56, LAPEO 114, LAPEO 121, *Staphylococcus sp.* LAPT 5, *Klebsiella sp.* LAPM 36, *Enterobacter cloacae* LAPM 43, *Alcaligenes sp.* LAPER 60 e *Ochrobactrum sp.* LAPEO 112 (Biomassa $> 1,8 \text{ mg mL}^{-1}$) (Anexo 3). No desdobramento dos dados, não houve interação significativa entre os parâmetros isolado e fonte de carbono, e por isso não foi necessário analisar a influência das fontes de carbono para cada isolado individualmente.

De modo geral, houve correspondência entre os resultados de crescimento nos dois métodos utilizados. Assim, optou-se por utilizar a leitura de densidade ótica nos ensaios subsequentes devido à facilidade de execução.

5.5.2) Atividade emulsificante (E_{24}) dos isolados bacterianos

Do total de 112 isolados avaliados, o sobrenadante de culturas de 100 (aproximadamente 89%) apresentou atividade emulsificante, destes 24% somente com a utilização da glicose, 12% somente com a utilização do óleo e 64% com a utilização de ambas as fontes (Anexo 3).

Isso está relacionado ao fato de que a fonte de carbono preferível para a produção de CAS microbianos, em geral, varia de acordo com a linhagem microbiana. O crescimento em hidrocarbonetos geralmente induz a síntese de CAS, mas isso não é um pré requisito para todos os micro-organismos o que tem motivado a realização de muitos trabalhos com o intuito de verificar a influência de diferentes fontes de carbono na produção de CAS por isolados específicos (SAIKIA *et al.*, 2012).

Das & Mukherjee (2007) estudaram a influência das fontes de carbono glicose, frutose, maltose, amido e glicerina, além de diferentes fontes de nitrogênio e

condições físicas na produção de CAS lipopeptídicos por duas diferentes linhagens de *B. subtilis*. Observou-se que a fonte de carbono mais favorável à produção foi a glicose, seguida da glicerina. Já em um trabalho semelhante com *P. fluorescens* Migula 1895-DSMZ e os substratos glicose, hexadecano e o óleo de oliva, a maior produção de CAS foi obtida a partir do óleo de oliva (ABOSEOUDE *et al.*, 2008).

A atividade emulsificante detectada variou estatisticamente de acordo com o isolado e com a fonte de carbono utilizada, sendo a glicose, de modo geral, a fonte que proporcionou as maiores médias. Também houve interação estatística significativa entre o isolado e a fonte de carbono utilizada e por isso a fonte de carbono foi analisada individualmente para cada isolado (Anexo 6).

Aproximadamente 60% dos isolados apresentaram valores de atividades emulsificantes estatisticamente iguais para as duas fontes de carbono e destes *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *Chryseobacterium joostei* LAPM 34; *Enterococcus sp.* LAPER 66 e *Ochrobactrum sp.* LAPEO 109 apresentaram índices de emulsificação acima de 60% para as duas fontes. Por sua vez, os índices de emulsificação em meio mineral com glicose foram estatisticamente maiores para aproximadamente 25% dos isolados e em óleo para 15% dos isolados (Anexo 3).

Os isolados foram agrupados em 5 classes, individualmente para cada fonte de carbono, definidas por meio da divisão da faixa de atividade obtida por 5, de acordo com os valores de atividade emulsificante ($a_5 > a_4 > a_3 > a_2 > a_1$). Na classe a1 se enquadraram os isolados que apresentaram atividades emulsificantes de 0-15,11% e que corresponderam a 45 (40,2%) para a glicose e 57 (52%) para o óleo. Na classe a2 os isolados que apresentaram atividade emulsificante de 15,12-30,23% e que corresponderam a 27 (24,1%) para a glicose e 19 (17%) para o óleo. Na classe a3 os isolados que apresentaram atividades emulsificantes de 30,24-45,35% e que corresponderam a 14 (12,5%) para a glicose e 11 (9,8%) para o óleo. Na classe a4 os isolados que apresentaram atividades emulsificantes de 45,35-60,47% e que corresponderam a 11 para a glicose (9,8%) e 13 para o óleo (11,16%). Na classe a5, os isolados que apresentaram as maiores atividades emulsificantes, de 60,48-75,60% e que corresponderam 15 para a glicose (13,4%) e 12 para o óleo (10,7%) (Tabela 4).

De acordo com Willumsen & Karlson (1997) um bom emulsificante deve ser capaz de apresentar um índice E_{24} superior a 50% e a maioria dos resultados publicados na literatura para diferentes isolados são valores em torno de 65% (FRANKENBERGUE

et al., 2005). Todos os isolados da classe a5 apresentaram índices E_{24} semelhantes aos obtidos em outros estudos. Dentre eles, os maiores índices de emulsificação obtidos, de 71,56%, 72,5%, 72,7%, 73,53%, 74,34%, 75% e 75,6%, respectivamente para os isolados *Ochrobactrum sp.* LAPEO 112; LAPER 58; *Staphylococcus sp.* LAPT 5; *Chryseobacterium joostei* LAPM 34; *Enterobacter cloacae* LAPM 43, *Acinetobacter sp.* LAPER 54 e *Enterobacter cloacae* LAPM 52, quando crescidos em meio mineral suplementado com glicose (Anexo 3), superam essa média e demonstram que esses isolados são promissores para uso e exploração da produção dessas biomoléculas.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* já foram relatadas anteriormente como produtoras de CAS (MARIANO et al., 2008), mas não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse um índice de emulsificação tão alto para um isolado desse gênero quanto o obtido nesse trabalho. Okpokwasili & Nweke (2003) relataram a produção de CAS por uma linhagem de *Staphylococcus sp.* isolada de solo contaminado com óleo que foi capaz de emulsificar o próprio óleo, mas os índices E_{24} máximos obtidos foram de 25%.

Poucos estudos têm relatado a produção de CAS por bactérias do gênero *Ochrobactrum*. Um deles é o trabalho de Ruggeri e colaboradores (2009), que dentre outros gêneros, isolaram uma linhagem de *Ochrobactrum sp.* com atividade emulsificante de 38%, quando crescida em glicose, além de Baker e colaboradores (2007) que isolaram uma linhagem da espécie *O. anthropi*, que não mostrou uma excelente atividade emulsificante mas foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para valores próximos de 40 mN m^{-1} .

A produção de CAS pela espécie *E. cloacae* já é conhecida e foi evidenciada em muitos trabalhos. Isolados dessa espécie produzem bioemulsificantes de elevado peso molecular que aumentam a viscosidade da fase aquosa e é relatado que eles também produzem uma elevada quantidade de gás por mol de substrato utilizado, o que torna esses isolados promissores para uso na recuperação avançada de petróleo (MOWLA et al., 2011). Exopolissacarídeos excretado por um isolado marinho da espécie *E. cloacae* foi capaz de emulsionar várias hidrocarbonetos, óleos minerais e óleos vegetais (IYER et al., 2006) e o EPS de uma outra estirpe dessa espécie, secretado quando o isolado era crescido em hexadecano, apresentou índices de emulsificação de xileno com valores próximos de 75% (LIU et al., 2010)

Diferentes espécies do gênero *Acinetobacter* produzem complexos de polissacarídeos ou proteínas que possuem propriedades tensoativas e por causa disso há uma grande quantidade de estudos relativos ao isolamento e produção dessas moléculas por isolados desse gênero (KAPLAN & ROSENBERG, 1986; SHETE, 2003; MUTHUSAMY *et al.* 2008). As espécies *A. calcoaceticus* e *A. radioresistens* são as mais estudadas por serem indicadas como importantes produtores de dois potentes bioemulsificantes, respectivamente o emulsan e o alasan (ZOSIM *et al.*, 1982; NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995). Entretanto há poucos estudos especificamente da espécie *A. junii*. Um deles é o de Patil & Chopade (2001) que relataram a capacidade do CAS produzido por um isolado dessa espécie, obtido de pele humana, em emulsificar óleo de oliva, mamona e pimenta.

Apesar de serem normalmente isoladas de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, como já mencionado, não foram encontrados relatos especificamente da produção de CAS por bactérias do gênero *Chryseobacterium*.

Foi possível observar que praticamente todos os isolados desse estudo que se enquadraram na classe a5 foram provenientes de métodos de isolamento que envolveram a utilização de hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 4). Isso está relacionado à seleção, nesses métodos, de um número maior de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, que muito comumente produzem CAS com atividade surfactante ou emulsificante, como forma de aumentarem a biodisponibilidade destes compostos hidrofóbicos no ambiente e sua posterior utilização como substrato (FLOODGATE, 1978; MARGESIN & SCHINNER, 2001; OLIVERA *et al.*, 2003).

Comparando-se os resultados de emulsificação dos sobrenadantes dos isolados com os de crescimento nas duas fontes de carbono observou-se que nem sempre o isolado que cresce mais produz mais CAS. Observou-se que 15% dos isolados que cresceram e produziram CAS com a utilização das duas fontes de carbono apresentaram um crescimento maior em glicose, porém melhores resultados da produção dessas moléculas com a utilização do óleo (Anexo 3).

Shavandi e colaboradores (2011) avaliando o crescimento e produção de CAS por *Rhodococcus sp.* a partir de sacarose, querosene, n-heptano, n-octano, n-hexadecano, n-parafina e gasolina, observaram que apesar da sacarose ter sido a

fonte que propiciou o maior aumento de biomassa, os melhores resultados quanto à produção de CAS foram obtidos com o cultivo em querosene e parafina.

Tabela 4. Valores de atividade emulsificante (E24) agrupados em cinco classes

| Faixa | Glicose | Óleo bruto |
|---|---|---|
| <p style="text-align: center;">a1 0,0-15,11%</p> | <p>Não identificados = LAPT 1, LAPT 8, LAPT 12, LAPT 14, LAPM 26, LAPM 42, LAPM 44, LAPER 55, LAPER 56, LAPER 63, LAPER 68, LAPER 83, LAPER 87, LAPEO 104, LAPEO 116;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 21, LAPT 22, LAPM 23, LAPM 39, LAPER 59, LAPER 70, LAPER 74, LAPER 76, LAPER 79, LAPER 82, LAPER 91, LAPER 95, LAPER 98, LAPEO 101, LAPEO 102, LAPEO 103, LAPEO 123;</p> <p><i>B. anthracis</i> LAPER 80;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 72, LAPER 73, LAPER 81, LAPEO 124;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPM 33;</p> <p><i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3;</p> <p><i>Acinetobacter junii</i> LAPM 30, LAPM 41;</p> <p><i>Enterococcus sp.</i> LAPEO 118;</p> <p><i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 117;</p> <p><i>O. intermedium</i> LAPM 28.</p> | <p>Não identificados = LAPT 1, LAPT 8, LAPT 14, LAPT 17, LAPM 26, LAPM 29, LAPM 32, LAPM 37, LAPM 42, LAPM 44, LAPM 45, LAPM 47, LAPM 51, LAPER 56, LAPER 58, LAPER 63, LAPER 68, LAPER 71, LAPER 87, LAPEO 115;</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPM 24, LAPM 40;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 21, LAPT 22, LAPM 23, LAPM 39, LAPER 69, LAPER 74, LAPER 76, LAPER 79, LAPER 86, LAPER 91, LAPER 95, LAPEO 97, LAPER 98, LAPEO 100, LAPEO 101, LAPEO 106, LAPEO 123;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 72, LAPER 73; LAPEO 124;</p> <p><i>B. pumilus</i> LAPER 77, LAPER 92;</p> <p><i>B. anthracis</i> LAPER 80;</p> <p><i>B. subtilis</i> LAPER 93;</p> <p><i>Escherichia coli</i> LAPM 31;</p> <p><i>Leucobacter sp.</i> LAPT 6;</p> <p><i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36;</p> <p><i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 94;</p> <p><i>Acinetobacter junii</i> LAPM 30;</p> <p><i>Kertesiasia gyorum</i> LAPEO 96;</p> <p><i>Shewanella sp.</i> LAPER 57;</p> <p><i>Ochrobactrum intermedium</i> LAPM 28;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPM 33.</p> |
| Total | 45 | 57 |
| <p style="text-align: center;">a2 015,12-30,23%</p> | <p>Não identificados = LAPM 29, LAPM 32, LAPM 38, LAPM 47, LAPM 48, LAPM 51, LAPER 85, LAPER 88, LAPEO 114, LAPEO 115</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPT 4, LAPM 40;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPM 49, LAPER 69, LAPEO 97; LAPEO 100, LAPEO 105, LAPEO 107;</p> <p><i>B. pumillus</i> LAPER 92;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPEO 99;</p> <p><i>B. subtilis</i> LAPER 93;</p> <p><i>Leucobacter sp.</i> LAPT 6;</p> <p><i>Kertesiasia gyorum</i> LAPEO 96;</p> <p><i>Escherichia coli</i> LAPM 31;</p> <p><i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36;</p> <p><i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50.</p> | <p>Não identificados = LAPER 55, LAPER 83, LAPER 88;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPT 9, LAPER 70, LAPER 82, LAPER 84, LAPEO 105;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPM 81;</p> <p><i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3,</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPT 4;</p> <p><i>E. cloacae</i> LAPM 43;</p> <p><i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 61;</p> <p><i>A. junii</i> LAPM 41;</p> <p><i>A. xiamenensis</i> LAPEO 119;</p> <p><i>Enterococcus sp.</i> LAPEO 118;</p> <p><i>Pseudomonas putida</i> LAPEO 111;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPER 78.</p> |
| Total | 27 | 19 |
| <p style="text-align: center;">a3 30,24-45,35%</p> | <p>Não identificados = LAPT 17, LAPM 37, LAPM 45, LAPM 46, LAPER 64;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 9, LAPER 84;</p> <p><i>B. pumillus</i> LAPER 77;</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPM 24;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPER 78;</p> <p><i>Alcaligenes sp</i> LAPER 94;</p> | <p>Não identificados = LAPM 38, LAPER 62, LAPER 64, LAPER 85;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPEO 103;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPEO 99;</p> <p><i>B. licheniformis</i> LAPT 20;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 5;</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPT 15;</p> |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| | <i>Acinetobacter xiamenensis</i> LAPEO 119; <i>Escherichia coli</i> LAPEO 113; <i>Shewanella sp.</i> LAPER 57. | <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 89. |
| Total | 14 | 11 |
| a4 45,36-60,47% | Não identificados = LAPEO 121, LAPER 62; <i>Enterobacter sp.</i> LAPT 15; <i>Bacillus sp.</i> LAPER 86, LAPEO 106; <i>B. subtilis</i> LAPER 90; <i>B. licheniformis</i> LAPT 20; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> LAPEO 122; <i>Pseudomonas putida</i> LAPEO 111; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 89. | Não identificados = LAPM 46, LAPEO 108, LAPEO 110, LAPEO 114, LAPEO 116, LAPEO 121; <i>Bacillus sp.</i> LAPM 49, LAPEO 102, LAPEO 107; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 112; <i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50; <i>Enterobacter cloacae</i> LAPM 52; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LAPM 53. |
| Total | 11 | 13 |
| a5 60,48-75,60% | Não identificados = LAPER 58, LAPER 71, LAPEO 108, LAPEO 110; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 112; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54, LAPER 61; <i>Enterobacter cloacae</i> LAPM 43; LAPM 52; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>S. maltophilia</i> LAPM 53; <i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 05; <i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34. | Não identificados = LAPT 12, LAPM 48, LAPEO 104; <i>Bacillus sp.</i> LAPER 59; <i>B. subtilis</i> LAPER 90; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 117; <i>Escherichia coli</i> LAPEO 113; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> LAPEO 122. |
| Total | 15 | 12 |

A maioria das pesquisas de CAS microbianos tem sido direcionada para moléculas bem caracterizadas produzidas principalmente pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* e *Cândida* (SAIMAI *et al.*, 2012b). No entanto, muitos isolados produtores de CAS, de gêneros filogeneticamente distintos, têm sido isolados de ambientes terrestres e aquáticos. Isso reforça a importância desses estudos que possibilitarão um maior conhecimento da diversidade, papéis fisiológicos, aplicações e potenciais dessas biomoléculas (BODOUR *et al.*, 2003; FRANKENBERGER *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2006).

5.5.3) Atividade surfactante dos isolados bacterianos

A atividade surfactante foi determinada por meio do teste do espalhamento da gota, que avalia o aumento do diâmetro da gota do sobrenadante em placas de poliestireno, e também por meio de leituras da tensão superficial do sobrenadante em tensiômetro.

Em relação ao teste de espalhamento da gota todos os isolados apresentaram atividade surfactante (AS) com a utilização de pelo menos uma das fontes de

carbono, indicada pela formação de gotas com diâmetros estatisticamente diferentes do controle.

Considerando-se os demais resultados, a atividade surfactante variou estatisticamente com o isolado, mas não variou com a fonte de carbono utilizada. Entretanto, a interação entre o isolado e a fonte de carbono foi significativa ($p < 0,05$) e por isso foi feito o desdobramento dos dados de AS obtidas com as 2 fontes de carbono para a variável isolado (anexo 7).

Nesse estudo 87,5% dos isolados apresentaram valores de atividades surfactantes estatisticamente iguais em ambas às fontes de carbonos. Já os isolados LAPT 1, LAPEO 114, *Bacillus pumilus* LAPER 92; *Rhodococcus sp.* LAPT 3; *Ochrobactrum sp.* LAPEO 117; *O. intermedium* LAPM 28; *Acinetobacter sp.* LAPER 61; *Staphylococcus sp.* LAPER 78 e (7,1% do total) apresentaram atividades surfactantes estatisticamente maiores quando crescidos em óleo bruto e os isolados LAPM 48; *Enterobacter sp.* LAPT 4; *Bacillus sp.* LAPEO 97 e LAPEO 107; *B. subtilis* LAPER 93; e *Acinetobacter xiamenensis* LAPEO 119 (5,4% do total) quando crescidos em glicose (anexo 3).

Os isolados também puderam ser agrupados em cinco faixas (a5>a4>a3>a2>a1) individualmente para as duas fontes de acordo com os resultados de espalhamento da gota. Os melhores resultados ficaram agrupados na classe a5. Na classe a1 ficaram agrupados os isolados que promoveram um espalhamento da gota de 0-0,44cm e que corresponderam a 68 (60,7%) para a glicose e 57 (50,9%) para o óleo. Na classe a2 os isolados que promoveram espalhamentos da gota de 0,45-0,87cm e que corresponderam a 30 (26,8%) para a glicose e 42 (37,5%) para o óleo. Na classe a3 os isolados que promoveram espalhamentos da gota de 0,88-1,31cm e que corresponderam a 10 (8,9%) para a glicose e 9 (8%) para o óleo. Na classe a4 os isolados que promoveram espalhamentos da gota de 1,32-1,73cm e que corresponderam a 2 (1,8%) para a glicose e 3 (2,7%) para o óleo. Na classe a5 os isolados que promoveram espalhamentos da gota de 1,74-2,17% e que corresponderam a 2 (1,8%) para o óleo e 1 (0,9%) para a glicose (Tabela 5).

Os maiores resultados, na classe a5, foram obtidos para os isolados *Ochrobactrum intermedium* LAPM 28 (2,17 cm), quando crescido em óleo e *Bacillus subtilis* LAPER 93 e *Bacillus sp.* LAPEO 107, quando crescidos em glicose (2,11 e 1,77 cm, respectivamente) (anexo 3).

Tabela 5. Valores de atividade surfactante (espalhamento da gota) agrupados em cinco classes

| Faixa | Glicose | Óleo bruto |
|--|--|--|
| <p>a1 0,00-0,44 cm</p> | <p>Não identificados=LAPT 1, LAPT 12, LAPT 22, LAPM 29, LAPM 32, LAPM 37, LAPM 38, LAPM 42, LAPM 44, LAPM 45, LAPM 46, LAPER 51, LAER 55, LAPER 56, LAPER 62, LAPER 63, LAPER 64, LAPER 85, LAPEO 104, LAPEO 110, LAPEO 114, LAPEO 115;</p> <p><i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3; <i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 5, LAPM 33, LAPER 78; <i>S. saprophyticus</i> LAPEO 122; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPT 9, LAPM 39, LAPER 49, LAPER 59, LAPER 69, LAPER 76, LAPER 79, LAPER 86, LAPER 91, LAPER 95, LAPEO 98, LAPEO 100, LAPEO 101, LAPEO 102, LAPEO 103, LAPEO 105, LAPEO 106; <i>B. pumilus</i> LAPER 77, LAPER 92; <i>B. megaterium</i> LAPER 72, LAPER 81, LAPEO 99, LAPEO 124; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>S. maltophilia</i> LAPM 53; <i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36; <i>Enterobacter sp.</i> LAPM 24, LAPM 40; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54, LAPER 61; <i>A. junii</i> LAPM 41; <i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50; <i>P. putida</i> LAPEO 111; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66, LAPEO 118; <i>Escherichia coli</i> LAPM 31, LAPEO 113; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 112, LAPEO 117.</p> | <p>Não identificados = LAPT 8, LAPT 12, LAPT 14, LAPM 37, LAPM 38, LAPM 42, LAPM 44, LAPM 46, LAPM 47, LAPM 48, LAPM 51, LAPER 56, LAPER 62, LAPER 63, LAPER 64, LAPER 71, LAPER 85, LAPER 87, LAPER 88, LAPEO 110, LAPEO 115;</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPT 4, LAPM 24; <i>Enterobacter cloacae</i> LAPM 43, LAPM 52; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPER 59, LAPER 69, LAPER 79, LAPER 82, LAPER 86, LAPER 91, LAPER 95, LAPEO 97, LAPEO 98, LAPEO 101, LAPEO 102, LAPEO 103 LAPEO 106; <i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 72 LAPER 73, LAPER 81, LAPEO 99; <i>B. pumilus</i> LAPER 77; <i>B. subtilis</i> LAPER 90, LAPER 93;</p> <p><i>B. anthracis</i> LAPER 80;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPM 33;</p> <p><i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34; <i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36; <i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50; <i>Enterococcus sp.</i> LAPEO 118; <i>Escherichia coli</i> LAPEO 113; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 112; <i>Acinetobacter xiamenensis</i> LAPEO 119.</p> |
| Total | 68 | 57 |
| <p>a2 0,45-0,87 cm</p> | <p>Não identificados =LAPT 14, LAPT 17, LAPM 26, LAPM 47, LAPM 57, LAPM 58, LAPER 68, LAPER 71, LAPER 83, LAPER 87, LAPER 88, LAPEO 108, LAPEO 121;</p> <p><i>Enterobacter sp.</i> LAPT 15; <i>E. cloacae</i> LAPM 43, LAPM 52; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 21, LAPER 70, LAPER 74, LAPER 82, LAPER 84, LAPEO 123; <i>B. licheniformis</i> LAPT 20; <i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 73; <i>B. anthracis</i> LAPER 80 <i>Ochrobactrum intermedium</i> LAPM 28; <i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 89; <i>Kertesgia gyorum</i> LAPEO 96.</p> | <p>Não identificados = LAPT 17, LAPM 26, LAPM 29, LAPM 32, LAPM 45, LAPM 55, LAPER 58, LAPER 68, LAPER 83, LAPEO 104, LAPEO 108, LAPEO 116, LAPEO 121;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 9, LAPT 22, LAPM 23, LAPM 39, LAPM 49, LAPER 70, LAPER 76, LAPER 84, LAPEO 100, LAPEO 105, LAPEO 107, LAPEO 123; <i>B. megaterium</i> LAPEO 124; <i>Enterobacter sp.</i> LAPT 15 LAPM 40; <i>Escherichia coli</i> LAPM 31; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>S. maltophilia</i> LAPM 53; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54, LAPER 61; <i>A. junii</i> LAPM 41; <i>Shewanella sp.</i> LAPER 57; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 89, LAPER 94; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66; <i>Pseudomonas putida</i> LAPEO 111; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> LAPEO 122; <i>Kertesgia gyorum</i> LAPEO 96.</p> |
| Total | 30 | 42 |

| | | |
|----------------------------------|--|---|
| a3 0,88-1,31 cm | Não identificados =LAPT 8, LAPM 48, LAPEO 116; <i>Bacillus sp.</i> LAPM 23, LAPEO 97; <i>B. subtilis</i> LAPER 90; <i>Acinetobacter junii</i> LAPM 30; <i>A. xiamenensis</i> LAPEO 119; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 94. | Não identificados = LAPEO 114; <i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3; <i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 5, LAPER 78; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 21, LAPER 74; <i>B. licheniformis</i> LAPT 20; <i>B. pumilus</i> LAPER 92; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 117. |
| Total | 10 | 9 |
| a4 1,32-1,73 cm | <i>Enterobacter sp.</i> LAPT 4; <i>Leucobacter sp.</i> LAPT 6. | Não identificados = LAPT 1 <i>Leucobacter sp.</i> LAPT 6; <i>Acinetobacter junni</i> LAPM 30. |
| Total | 2 | 3 |
| a5 1,74-2,17 cm | <i>Bacillus subtilis</i> LAPER 93; <i>Bacillus sp.</i> LAPEO 107. | <i>Ochrobactrum intermedium</i> LAPM 28. |
| Total | 2 | 1 |

A atividade surfactante, determinada pela medida de tensão superficial, foi avaliada em 103 isolados do total de 112. A mesma variou estatisticamente com o isolado e com a fonte de carbono utilizada ($p < 0,05$), sendo a glicose a fonte que de modo geral, proporcionou as maiores médias. A interação entre a fonte de carbono e o isolado também foi significativa e por isso a influência da fonte de carbono foi avaliada individualmente para cada isolado (anexo 8).

Para 77% dos isolados o resultado de redução da tensão superficial do meio foi estatisticamente igual para as duas fontes, para 12,6% foi maior em meio mineral suplementado com glicose e 6,8% em meio mineral suplementado com óleo.

Os isolados bacterianos foram agrupados em 5 classes ($a5 < a4 < a3 < a2 < a1$), como descrito anteriormente, individualmente para as duas fontes de carbono, sendo que os maiores valores de redução da tensão superficial em relação ao controle de $69,25 \text{ mN m}^{-1}$ ficaram agrupados na classe nas classes a1. Na classe a5 ficaram agrupados os isolados que promoveram reduções do meio para $68,02-60,25 \text{ mN m}^{-1}$, que corresponderam a 28 (27,18%) para a glicose e 16 (15,53%) para o óleo. Na classe a4 os isolados que promoveram reduções do meio para $60,24-50,10 \text{ mN m}^{-1}$, que corresponderam a 34 (33%) para a glicose e 48 (46,6%) para o óleo. Na classe a3 os isolados que promoveram reduções do meio para $50,09-41,48 \text{ mN m}^{-1}$, que corresponderam a 32 (31,06%) para a glicose e 29 (28,15%) para o óleo. Na classe a2 os isolados que promoveram reduções do meio para $41,47-35,07 \text{ mN m}^{-1}$, que corresponderam a 6 (5,82%) para a glicose e 9 (8,74%) para o óleo. Na classe a1, os

isolados que promoveram as maiores reduções do meio para valores de 35,06 a 29,89 mN m⁻¹, que corresponderam a 3 (2,91%) para a glicose e 1 (0,97%) para o óleo (Tabela 6).

Segundo Desai & Banat (1997), micro-organismos bons produtores de CAS devem reduzir a tensão superficial do meio para valores próximos de 35mN m⁻¹ e segundo Cooper (1986) micro-organismos capazes de reduzir a tensão para valores inferiores a 40 mN m⁻¹ já podem ser considerado promissores quanto à produção dessas moléculas e potencialmente exploráveis. Dessa maneira, o padrão de redução de tensão observados para as classes a 2 e a1 permitem classificar esses isolados como bons produtores de surfactantes, principalmente os isolados da classe a1, que são *Bacillus subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp.* LAPER 94, quando cultivados em glicose, e *Bacillus sp.* LAPM 39, quando crescido em óleo (Tabela 6), que foram capazes de reduzir a tensão do meio para valores de 33, 29,9, 30,5 e 34,27 mN m⁻¹ respectivamente, o que corresponde às respectivas reduções da tensão superficial de 52, 56, 58 e 50,5% (Anexo 3).

Os melhores valores de redução final da tensão superficial obtidos nesse trabalho são superiores aos valores descritos em outros trabalhos semelhantes, de isolamento e prospecção de bactérias a partir de ambientes contaminados com petróleo. Batista e colaboradores (2006), por exemplo, isolaram 17 bactérias produtoras de CAS a partir de amostras de água de praias brasileiras contaminadas com óleo e os melhores resultados obtidos por 6 isolados, foi uma redução do meio para valores próximos de 40 mN m⁻¹.

Tabela 6. Valores finais de redução da tensão superficial do sobrenadante agrupados em cinco classes

| Faixa | Glicose | Óleo bruto |
|--|---|--|
| a1 29,89-35,06 mN m ⁻¹ | <i>Bacillus subtilis</i> . LAPER 90, LAPER 93; <i>Acaligenes sp.</i> LAPER 94. | <i>Bacillus sp.</i> LAPM 39. |
| Total | 3 | 1 |
| a2 35,07-41,47 mN m ⁻¹ | Não identificados =LAPT 14; <i>Bacillus sp.</i> LAPER 49, LAPER 84; <i>B. licheniformis</i> LAPT 20; <i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34; <i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36. | Não identificados = LAPM 32, LAPM 37, LAPM 38, LAPM 42, LAPM 45; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 22, LAPER 84; <i>Shewanella sp.</i> LAPER 57; <i>Chryseobacterium joostei</i> LAPM 34. |
| Total | 6 | 9 |

| | | |
|---|--|---|
| <p>a3 41,48-50,09 mN m⁻¹</p> | <p>Não identificados = LAPT 12, LAPT 17, LAPM 26, LAPM 29, LAPM 32, LAPM 37, LAPM 42, LAPM 44, LAPM 45, LAPM 46, LAPER 62;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPT 9, LAPT 21, LAPT 22, LAPM 23, LAPM 39, LAPER 70, LAPER 76; <i>Enterobacter sp.</i> LAPT 4, LAPT 15, LAPM 40; <i>E. cloacae</i> LAPM 43; <i>Leucobacter</i> LAPT 6; <i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 5, LAPM 33; <i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 117; <i>O. intermedium</i> LAPM 28; <i>Acinetobacter junii</i> LAPM 30, LAPM 41; <i>A. xiamenensis</i> LAPEO 119.</p> | <p>Não identificados =LAPT 12, LAPT 14, LAPT 17, LAPM 26, LAPM 29, LAPM 44, LAPER 62, LAPER 68;</p> <p><i>Staphylococcus sp.</i> LAPT 5, LAPM 33; <i>Bacillus sp.</i> LAPT 7, LAPT 9, LAPT 21, LAPM 23, LAPM 49; <i>B. licheniformis</i> LAPT 20; <i>Leucobacter sp.</i> LAPT 6; <i>Enterobacter sp.</i> LAPM 40; <i>Enterobacter cloacae</i> LAPM 43; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66; <i>Escherichia coli</i> LAPM 31; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54; <i>Acinetobacter junii</i> LAPER 30, LAPER 41; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>Klebsiella sp.</i> LAPM 36; <i>Ochrobactrum intermedium</i> LAPM 28; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 94; <i>Kertesgia gyiorum</i> LAPEO 96.</p> |
| <p>Total</p> | <p>32</p> | <p>29</p> |
| <p>a4 50,10-60,24 mN m⁻¹</p> | <p>Não identificados = LAPT 8, LAPM 38, LAPM 47, LAPM 48, LAPM 51, LAPER 58, LAPER 71, LAPER 85, LAPEO 121;</p> <p><i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3; <i>Bacillus sp.</i> LAPER 59, LAPER 69, LAPER 74, LAPER 86, LAPER 91, LAPEO 100, LAPEO 102, LAPEO 103, LAPEO 105; <i>B. megaterium</i> LAPEO 99; <i>B. pumilus</i> LAPER 77, LAPER 92; <i>B. anthracis</i> LAPER 80; <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27; <i>Escherichia coli</i> LAPM 31; <i>Enterobacter sp.</i> LAPM 24; <i>Enterobacter cloacae</i> LAPM 52; <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54; <i>Shewanella sp.</i> LAPER 57; <i>Kertesgia gyiorum</i> LAPEO 96; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 112; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> LAPEO 122.</p> | <p>Não identificados = LAPT 8, LAPM 46, LAPM 48, LAPM 51, LAPER 55, LAPER 58, LAPER 71, LAPER 83, LAPER 88, LAPEO 104, LAPEO 108, LAPEO 110, LAPEO 115, LAPEO 116, LAPEO 121;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPER 59, LAPER 69, LAPER 70, LAPER 76, LAPER 91, LAPER 95, LAPER 98, LAPEO 100, LAPEO 102, LAPEO 103, LAPEO 105, <i>B. anthracis</i> LAPER 80;</p> <p><i>B. megaterium</i> LAPEO 99, LAPEO 124; <i>B. pumilus</i> LAPER 77, LAPER 92; <i>B. subtilis</i> LAPER 90, LAPER 93; <i>Rhodococcus sp.</i> LAPT 3; <i>Pseudomonas sp.</i> LAPM 50; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LAPM 53; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 89; <i>Eterobacter sp.</i> LAPT 4, LAPT 15, LAPM 24; <i>E. cloacae</i> LAPM 52; <i>Acinetonacter sp.</i> LAPM 61; <i>A. xiamenensis</i> LAPEO 119; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 109, LAPEO 112; <i>Escherichia coli</i> LAPEO 113; <i>Staphylococcus saprophyticus</i> LAPEO 122.</p> |
| <p>Total</p> | <p>34</p> | <p>48</p> |
| <p>a5 60,25-68,02 mN m⁻¹</p> | <p>Não identificados = LAPER 55, LAPER 68, LAPER 83, LAPEO 104, LAPEO 108, LAPEO 110, LAPEO 114, LAPEO 115, LAPEO 116, LAPEO 121;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPER 82, LAPER 95, LAPEO 97, LAPER 98, LAPEO 101, LAPEO 107, LAPEO 123; <i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 73, LAPER 81, LAPEO 124; <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 61; <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60, LAPER 89; <i>Enterococcus sp.</i> LAPEO 118;</p> | <p>Não identificados = LAPM 47, LAPER 85, LAPEO114;</p> <p><i>Bacillus sp.</i> LAPER 74, LAPER 82, LAPER 86, LAPEO 97, LAPEO 101, LAPEO 107, LAPEO 123; <i>B. megaterium</i> LAPER 67, LAPER 73, LAPER 81; <i>Pseudomonas putida</i> LAPEO 111; <i>Ochrobactrum sp.</i> LAPEO 117; <i>Enterococcus sp.</i> LAPEO 118.</p> |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| | <i>Escherichia coli</i> LAPEO 113; <i>Pseudomonas putida</i> LAPEO 111; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LAPM 53. | |
| Total | 28 | 16 |

Isolados do gênero *Bacillus* são comumente relatados como bons produtores de CAS (DESAI *et al.*, 2008b; JING *et al.*, 2011), com destaque para a espécie *B. subtilis*, cujas biomoléculas vem despertando grande interesse devido à sua alta atividade superficial e potencial terapêutico (SANDRIN *et al.*, 1990; BESSON & MICHEL., 1992). Os valores de tensão obtidos pelos isolados de *B. subtilis* nesse trabalho (33 mN m⁻¹ e 29.9 mN m⁻¹) estão em acordo com os valores de tensão obtidos para outros isolados dessa espécie avaliados em diferentes trabalhos. Em Gudna e colaboradores (2012), por exemplo, foram obtidos valores de tensão para isolados de *B. subtilis* na faixa de 29,9-32,0 mN m⁻¹. Diferentes aplicações já foram descritas para CAS produzidos por isolados dessa espécie, incluindo recuperação avançada de petróleo, com taxas de remoção do óleo residual em colunas empacotadas com areia variando de 22 a 60% (SUTHAR *et al.*, 2008; PORNSUNTHORNTAWEE *et al.*, 2008). Adicionalmente estudos dessas biomoléculas demonstraram que elas são estáveis em condições extremas de pH, temperatura e força iônica (SCHALLER *et al.*, 2004).

A produção de CAS já foi relatada para algumas espécies do gênero *Alcaligenes*, principalmente *A. faecalis*, que é a espécie mais estudada do gênero em relação à produção dessas biomoléculas (RAKATOZAFY *et al.*, 1999; CALVO *et al.*, 2008). Bharali e colaboradores (2011) estudaram um CAS produzido por uma linhagem de *A. faecalis* que reduziu a tensão do meio de 71.6 para 32.3 mN m⁻¹, valor um pouco maior do que foi obtido nesse trabalho (30,5 mN m⁻¹).

Comparando-se os dados obtidos pelos dois métodos utilizados para avaliar a atividade surfactante, o espalhamento da gota e a redução de tensão superficial, verifica-se que houve corespondência, pois com a exceção de alguns isolados, a maioria que apresentou bons resultados com o uso de uma técnica também apresentou bons resultados com o uso da outra e vice-versa.

Há diversos métodos de triagem conhecidos para a detecção de micro-organismos produtores de biosurfactantes/bioemulsificantes. Estes métodos incluem hemólise em ágar sangue, hidrofobicidade de superfície celular, colapso da gota, espalhamento da gota, propagação do óleo, formação de halos em meio contendo CTAB-azul de

metileno, atividade emulsificante, redução de tensão superficial/interfacial, dentre outros (CHOPADE *et al.*, 2010b). A maioria dos trabalhos de prospecção de micro-organismos produtores de CAS não utiliza um único método de seleção porque um mesmo isolado não apresenta, necessariamente, resultados positivos para todos esses métodos de triagem já que muitos deles detectam CAS estruturalmente diferentes (MANEERAT & PHETRONG., 2007). Assim, o uso dos dois métodos nesse trabalho foi importante para se obter um maior número de isolados com potencial de produção dessas moléculas estruturalmente diferentes.

O número de isolados que apresentaram produção de CAS com atividade surfactante expressiva variou de acordo com o método de seleção empregado para a obtenção dos isolados, sendo que nas classes a2 e a1 85% deles foram isolados a partir de métodos nos quais houve a adição de combustíveis às amostras. Entretanto, nem todos os isolados que foram capazes de crescer em meios com hidrocarbonetos produziram CAS. Há explicações para isso, pois micro-organismos possuem outras estratégias pra acessar hidrocarbonetos além da produção de CAS. Alguns micro-organismos possuem superfícies celulares hidrofóbicas que permitem o seu contato direto com moléculas pouco solúveis, outros podem degradar hidrocarbonetos a partir da solubilização dos mesmos por CAS excretados por outros micro-organismos presentes nas amostras (GRAY *et al.*, 2004; CAMEOTRA & SINGH, 2009).

Assim como ocorreu para a atividade emulsificante, nem sempre a fonte responsável pelo maior crescimento celular foi a fonte responsável pela maior produção de CAS, pois muitos isolados tiveram bons resultados da produção de surfactantes somente quando crescidos em meio mineral suplementado com óleo bruto (Anexo 3). Também muitos isolados apresentaram alta atividade emulsificante, mas não mostraram alta atividade surfactante e vice-versa, o que é provavelmente devido ao tipo de CAS produzido. CAS podem ser de baixo peso molecular, agindo através da diminuição da tensão interfacial água-óleo, ou de elevado peso molecular, agindo como biomulsificantes responsáveis por estabilizar emulsões água-óleo e CAS com atividade emulsificante não afetam necessariamente a tensão da superfície e vice-versa (CALVO *et al.*, 2006). Aparentemente no presente trabalho foi possível isolar mais bactérias produtoras de bioemulsificantes do que biosurfactantes.

5.6) Produção de enzimas degradativas de hidrocarbonetos

Um total de 70 isolados que apresentaram crescimento satisfatório em óleo bruto foi avaliado quanto à presença de enzimas catecol 1,2 ou 2,3 dioxigenases e alcano hidroxilases do grupo II e III (Tabela 7).

5.6.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol

A produção das enzimas catecol 1,2 e 2,3 dioxigenases foi determinada por ensaios colorimétricos para detecção de produtos específicos das vias catalisadas por elas e pela detecção dos genes responsáveis pela codificação dessas enzimas.

5.6.1.1) Determinação da presença de vias de clivagem do catecol por testes colorimétricos e pela determinação da presença dos genes responsáveis pela codificação dessas enzimas.

A partir dos ensaios colorimétricos foi possível visualizar o aparecimento de cor roxa para os isolados LAPM 38, LAPM 42, LAPER 62 e *Alcaligenes sp.* LAPER 60, LAPER 89 e LAPEO 94, sugerindo o acúmulo de β -cetoadipato e conseqüentemente a produção da enzima catecol 1,2 dioxigenase (via de orto clivagem do catecol). Não foi possível observar o aparecimento da cor amarela, indicativa do acúmulo de ácido 2-hidroximucônico semialdeído e conseqüentemente a produção da enzima catecol 2,3 dioxigenase (via de meta clivagem do catecol) para nenhum dos isolados testados.

Nos isolados onde sua presença foi confirmada, foi determinada a atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase por meio de ensaios enzimáticos que avaliaram a taxa de formação de cis,cis-muconato a partir do catecol. Não houve grande variação na atividade dessa enzima entre os isolados, mas aquele que apresentou o maior valor foi o LAPER 62 (aproximadamente 0,2 unidades de atividade enzimática) (Figura 9).

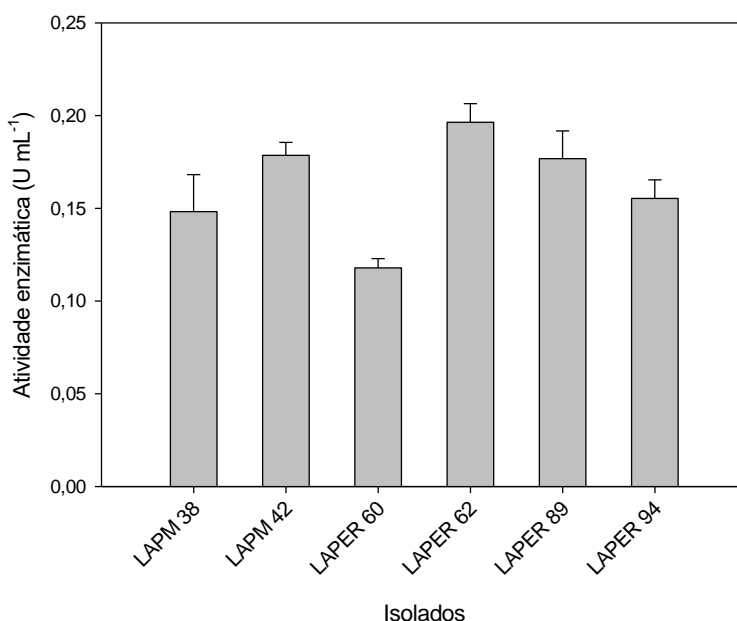


Figura 9: Atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase expressa em unidades de atividade enzimática (U) por mL de extrato celular, para os isolados nos quais a via de orto clivagem foi detectada. Barras indicam os valores de desvio padrão. Por essa metodologia também não foi possível confirmar sua presença nos mesmos. O resultado da detecção dos genes responsáveis pela codificação da enzima catecol 1,2-dioxigenase pode ser visualizado na figura 10. Somente nos isolados LAPER 62; *Pseudomonas sp.* LAPM 50 e *P. putida* LAPEO 111, foi possível observar a amplificação de fragmentos com o tamanho esperado, de 282 pares de bases, e dentre eles só o isolado LAPER 62 também apresentou a presença dessa enzima pelos ensaios colorimétricos. Não foi detectada a presença dos genes que codificam a enzima catecol 1,2-dioxigenase nos isolados LAPM 38, LAPM 42 e *Alcaligenes sp.* LAPER 60, LAPER 89 e LAPER 94, o que seria esperado, e por outro lado, os isolados *Pseudomonas sp.* LAPM 50 e *P. putida* LAPEO 111, que não confirmamos como produtores dessa enzima pelos ensaios colorimétricos, apresentaram a presença do gene que a codifica.

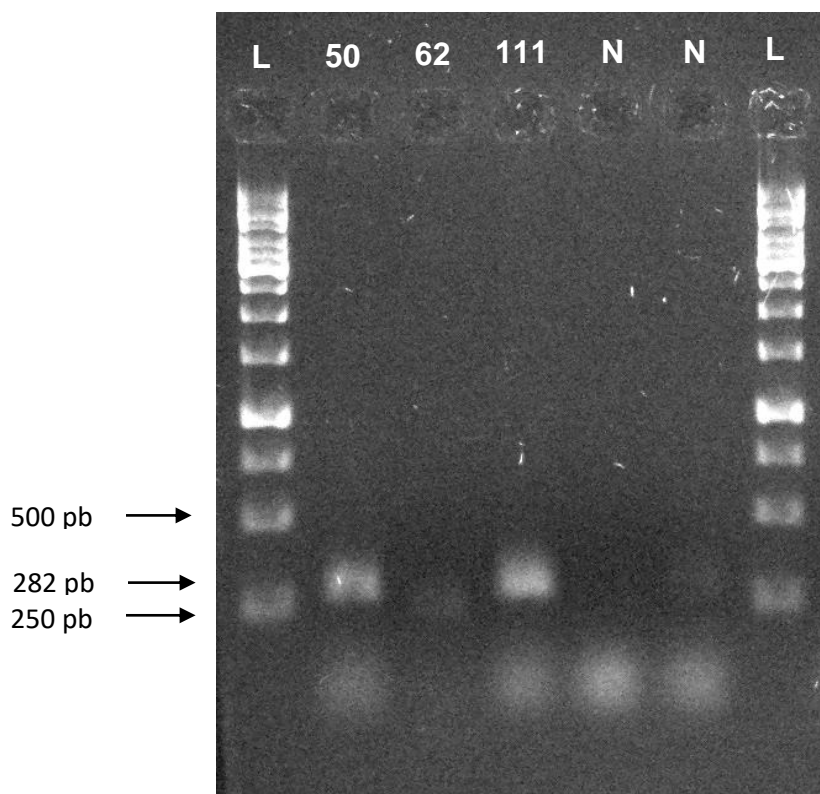


Figura 10: Amplificações do gene responsável pela codificação da enzima catecol 1,2 dioxigenase utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 50, 62 e 111 os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes.

A presença da via de orto-clivagem do catecol para isolados desses gêneros já foi relatada em trabalhos anteriores. Van der Meer e colaboradores (1991) relataram a detecção de dois genes sequenciais envolvidos na degradação de benzeno no plasmídeo P51 de uma linhagem de *Pseudomonas sp.* que confirmaram ser responsáveis por codificar a enzima catecol 1,2-dioxigenase. Dorn & Knackmuss (1978) confirmou a presença da enzima catecol 1,2-dioxigenase pela linhagem *Alcaligenes eutrophus B9*, após sistema de indução com benzoato, que apresentou uma atividade enzimática de 0,4U/mg de proteína.

Enzimas das vias de clivagem do catecol têm sido caracterizadas em uma grande variedade de micro-organismos isolados principalmente a partir de amostras de solo (HARWOOD & PARALES.,1996). Poucos trabalhos têm investigado a presença dessas enzimas em isolados de outros tipos de ambientes. Ensaios que confirmam a presença dessas enzimas ou a presença dos genes responsáveis por codificá-las são bons marcadores para a detecção de uma grande variedade de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos ou do potencial de degradação dos mesmos a partir da comunidade bacteriana de um local impactado (SEI *et al.*, 1999).

Neste trabalho, não foi possível detectar a presença da via de meta clivagem do catecol em nenhum isolado, e mesmo para a via de orto clivagem a quantidade de isolados identificados foi muito pequena. Esse resultado não era esperado pelo fato de muitos desses isolados terem sido obtidos a partir de enriquecimento em meio mineral com óleo como única fonte de carbono por quase um mês. Além disso ambas as vias já foram descritas para vários gêneros identificados nesse trabalho, como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, dentre outros (PATEL *et al.*, 1976; ASTURIAS *et al.*, 1994; LINGENS *et al.*, 1994; SINGH *et al.*, 2009).

Adicionalmente, não houve uma correspondência entre os métodos utilizados para detecção de isolados produtores da catecol 1,2-dioxigenase, pois era esperado que os isolados positivos quanto aos testes colorimétricos tivessem os genes responsáveis por codificá-la detectados e vice-versa, o que não ocorreu para a maioria dos isolados avaliados.

Há algumas possíveis explicações para esses resultados. Nos ensaios colorimétricos ou de atividade enzimática para detecção de vias de clivagem do catecol é comum crescer previamente os isolados em meio adicionado de um composto aromático, que sirva como fonte de carbono e energia para o micro-organismo, ou produtos intermediários da via degradativa, para que ocorra a indução da síntese de enzimas dessas vias (HEINARU *et al.*, 2000; KHLEIFAT, 2006). Vários indutores podem ser utilizados, mas a escolha do indutor mais adequado depende de um conhecimento prévio da capacidade de degradação de aromáticos pelos micro-organismo avaliados, informação que não tínhamos. No trabalho de Wojcieszynska e colaboradores (2011), foi avaliada a influência da utilização dos indutores 4-ácido-hidroxibenzóico, 3,4-ácido dihidroxibenzóico, hidroquinona, fenol, 2-nitrofenol, 3-nitrofenol e 4-nitrofenol na expressão de enzimas dioxigenases por *Stenotrophomonas maltophilia* cepa KB2. Foi observado a presença das vias de orto e meta clivagem do catecol, mas as mesmas foram induzidas por compostos aromáticos diferentes, a atividade da catecol 1,2-dioxigenase (orto clivagem), de forma expressiva, somente com a utilização de benzoato e a atividade da catecol 2,3-dioxigenase (meta clivagem) somente com a utilização de fenol.

Também, o período de incubação de um isolado com o indutor para que a via seja detectada tem-se mostrado variável em muitos trabalhos. No trabalho de Singh e colaboradores (2009), foi avaliada a degradação de pentaclorofenol por um consórcio formado por um isolado de *B. cereus* e dois isolados de *Serratia marcescens* e, ainda a indução de enzimas da orto e meta clivagem por ensaios colorimétricos, ao longo de período de 168 horas. O consórcio degradou mais de 93% do pentaclorofenol ao longo de todo o período de incubação, inclusive no início, mas a cor amarela não apareceu em nenhum momento o que indicou a ausência da via de meta clivagem. O surgimento da coloração roxa, indicativo da presença da via de orto-clivagem, foi observado somente após 144 h de incubação. No nosso estudo foi utilizado um período de indução de 24 h, e o mesmo pode não ter sido suficiente para a produção de concentrações das enzimas passíveis de serem detectadas no teste colorimétrico.

Em relação aos resultados de PCR, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados conseguem detectar uma grande variedade de genes codificadores da enzima catecol 1,2 dioxigenase, mas não são universais e por isso podem não ser adequados para todos os gêneros de isolados avaliados (SEI *et al.*, 1999). Dessa maneira, seria

necessário a utilização de outros pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção da enzima catecol 1,2-dioxigenase em cada gênero. Além disso, em muitas bactérias, os genes responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos estão localizados em plasmídeos, incluindo genes para o catabolismo de naftaleno (MADSEN *et al.*, 1998), tolueno, xileno (ASSINDER & WILLIAMS, 1990), fenol (KIVISAAR *ET AL.*, 1990), isopropilbenzeno (KESSELER *et al.*, 1996), fenantreno (SAYLER *et al.*, 1993). No nosso estudo, as reações de amplificação foram feitas a partir de DNA cromossômico. Diante disso, genes localizados em DNA plasmidial não puderam ser detectados; não podendo ser excluída a possibilidade de presença de plasmídeos grandes na amostra, já que esses plasmídeos grandes podem ser extraídos e purificados juntamente com o DNA cromossômico, como acontece com o plasmídeo TOL de *P. putida* (THOMAS *et al.*, 2002).

A não correspondência entre diferentes ensaios também não é incomum. Em Cunha e colaboradores (2006) foi avaliada a degradação de óleo por 16 isolados do gênero *Bacillus* e também a detecção das vias de clivagem do catecol por ensaios enzimáticos, após eles terem sido cultivados com o indutor naftaleno, e pela detecção dos genes por PCR. Três cepas que apresentaram amplificação positiva para via de meta clivagem não tiveram a presença da enzima catecol 2,3-dioxigenase confirmada por ensaios enzimático e esse e outros trabalhos tem sugerido que outras enzimas e vias ainda não conhecidas possam estar envolvidas nesse processo e que o mesmo precisa se melhor investigado (LOH & CHUA, 2002).

5.6.2) Determinação da produção de enzimas alcano-hidroxilases

Nesse trabalho utilizou-se dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de dois grupos diferentes de genes codificadores de enzimas alcano hidroxilases (SEI *et al.*, 2003). Os iniciadores 2F/2R, responsáveis pela detecção dos genes alk-M (grupo II), que codificam alcano hidroxilases que catalisam n-alcanos de cadeia média (C8-C16) e os iniciadores alk 3F/3R responsáveis pela detecção dos genes alk-B (grupo III), que codificam alcano hidroxilases que catalisam n-alcanos de cadeia longa (> C16) (KOHNO *et al.*, 2002; SEI *et al.*, 2003).

Detectou-se a presença de fragmentos de amplificação dos genes do grupo II, com tamanho de 271 pb, em 10 isolados (LAPM 42, LAPM 46, LAPM 48, LAPER 62, LAPER 63; *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *Enterobacter cloacae* LAPM 43,

Acinetobacter sp. LAPER 61 e *A. junii* LAPM 30 e LAPM 41) (Figura 11). A presença de fragmentos de amplificação dos genes do grupo III, com tamanho de 330 pb, foi detectada em 14 isolados (LAPER 55, LAPER 62, LAPEO 104; *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *Acinetobacter sp.* LAPER 61; *A. junii* LAPM 30 e LAPM 41; *Staphylococcus sp.* LAPM 33; *Pseudomonas sp.* LAPM 50; *Enterococcus sp.* LAPER 66 e *Bacillus sp.* LAPER 59, LAPEO 102, LAPEO 103 e LAPEO 105 (Figura 12).

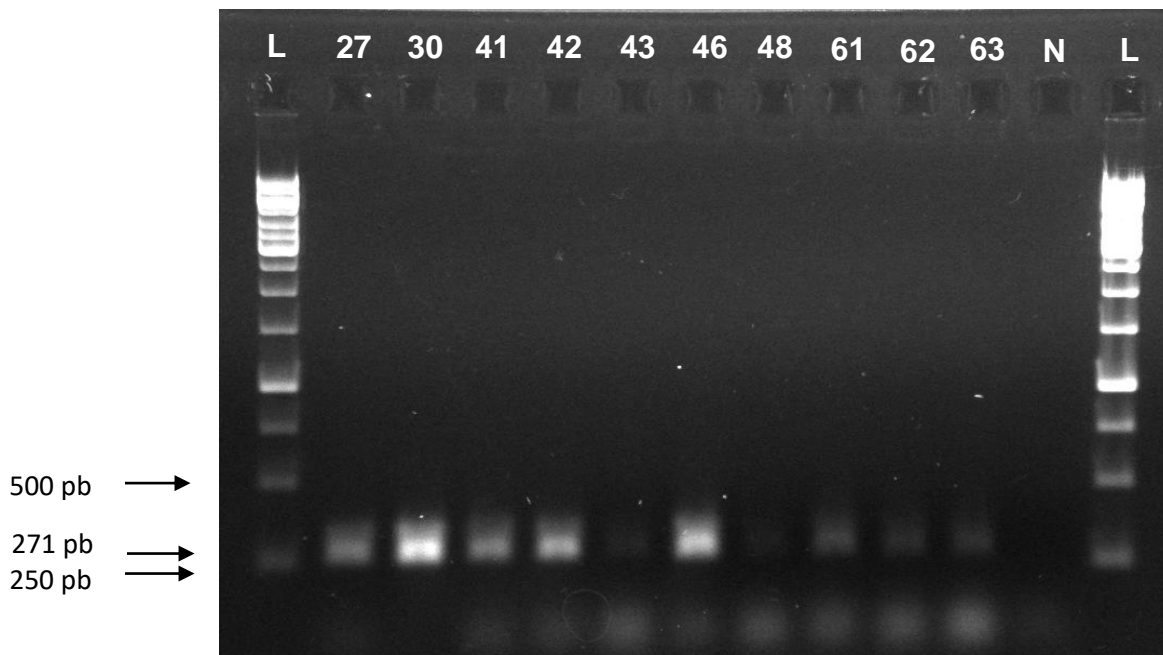


Figura 11: Amplificações dos genes responsáveis pela codificação das enzimas alceno hidroxilases (grupo II), utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 27, 30, 41, 42, 43, 46, 48, 61, 62 e 63, os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes.

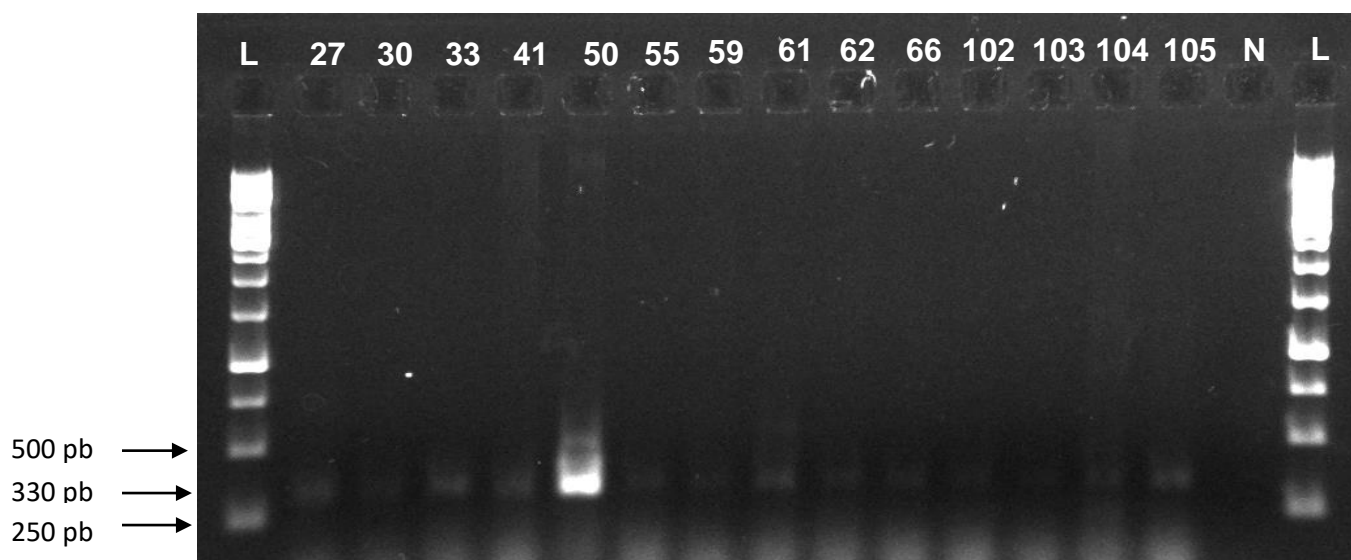


Figura 12: Amplificações dos genes responsáveis pela codificação das enzimas alceno hidroxilases (grupo III), utilizando o DNA dos isolados selecionados. As letras L nas extremidades representam o padrão de 1 Kb DNA LADDER; a letra N o controle negativo e os números 27, 30, 41, 50, 55, 59, 61, 62 e 66, 102, 103, 104 e 105 os isolados nos quais foi detectada a presença desses genes.

Assim, apesar de ter havido variação na detecção de genes de um ou outro grupo em isolados diferentes, em cinco deles, LAPER 62, *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *Acinetobacter sp.* LAPER 61 e *A. junii* LAPM 30 e LAPM 41, foi detectada a presença de genes de ambos os grupos.

Os genes do grupo II codificam o sistema de degradação da alceno hidroxilase representado por *Acinetobacter sp.* Há relatos da detecção de genes desse grupo também em isolados dos gêneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium aquimaris*, *Marinobacter* (KOHNO *et al.*, 2002; CAPELO *et al.*, 2012). Ainda não há relatos da detecção de genes que codificam alceno hidroxilases em *Stenotrophomonas sp.* e *Enterobacter cloacae* utilizando esse grupo de primers, mas já foi confirmada a detecção da presença de genes codificadores dessas enzimas em ambos com a utilização de conjuntos diferentes de oligonucleotídeos iniciadores, sintetizados por outros autores. No gênero *Stenotrophomonas* foram detectados genes alkB no plasmídeo OCT (LEE *et al.*, 1996) e na espécie *E. ludwigii*, filogeneticamente relacionada com *E. cloacae*, a presença de genes CYP153, que se provou estarem diretamente ligado à degradação de alcanos (YOSAF *et al.*, 2011).

Os genes do grupo III codificam o sistema de degradação da alceno hidroxilase presente nos gêneros *Amycolatopsis*, *Rhodococcus*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* (KOHNO *et al.*, 2002). Há relatos da detecção dos genes desse grupo também em

isolados do gênero *Bacillus* e *Acinetobacter* (VONBERG & CLINNER, 2000; CUNHA *et al.*, 2006; GITI & MEHDI, 2009 CAPELO *et al.*, 2012). Novamente também não há relatos da amplificação de genes de isolados de *Stenotrophomonas* especificamente com esse grupo de oligonucleotídeos iniciadores e para o gênero *Staphylococcus* não foram encontrados relatos da detecção ou caracterização de quaisquer genes responsáveis por codificar enzimas alcano-hidroxilases, o que torna promissor um maior aprofundamento do estudo desse isolado.

Nos isolados desse trabalho houve predominância, principalmente naqueles obtidos pela técnica de enriquecimento em óleo bruto, da presença de genes do grupo III. Esses genes, como já foi mencionado, codificam enzimas responsáveis pela degradação de n-alcenos de cadeias longas (>C16), predominantes no óleo bruto, e sua presença nesses isolados explica porque eles foram favorecidos no processo de enriquecimento (CAPPELLO *et al.*, 2012). Vonberg & Cliner (2000) isolaram 45 bactérias degradadoras de alcanos pertencentes a 37 espécies diferentes a partir de solo contaminado com óleo bruto na Alemanha. Eles estudaram a distribuição dos genes alk nesses isolados e também concluíram que a presença de genes do grupo III nos mesmos era predominante.

A alcano-hidroxilase é uma enzima chave na degradação de alcanos por catalisar a etapa inicial desse processo e por isso desempenha um papel importante na biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos (HASSANSYAHIAN *et al.*, 2010). A presença de genes responsáveis pela codificação dessas enzimas já foi confirmada em bactérias isoladas de vários ambientes contaminados como sedimentos, solos, aquíferos e sistemas de landfarming (CAPPELLO *et al.*, 2012). Por isso, a detecção da presença desses genes também pode ser utilizada como um marcador para prever o potencial de degradação de petróleo por comunidades bacterianas de diferentes ambientes (VAN BEILEN *et al.*, 2003). Dentro desse contexto, detectar especificamente a presença dos genes de alcano-hidroxilases dos grupos (II) e (III) é muito importante, pois como eles codificam enzimas que degradam n-alcenos de cadeias médias-longa permitem acompanhar a degradação dos poluentes que se mantêm por períodos relativamente longos após a contaminação da área (HASSANSYAHIAN *et al.*, 2010).

Apesar da importância, há algumas limitações na utilização desses primers para detecção dos genes alk, pois o design dos mesmos, realizado por Kohno e

colaboradores (2002), foi baseado em 16 cepas cujas informações e sequências dos genes responsáveis pela degradação de alcanos se encontravam depositadas no GenBank. Após sintetizar os grupos de oligonucleotídeos, 74 isolados caracterizados como degradadores de alcanos foram avaliados com os mesmos, mas só foi possível detectar a presença dessas enzimas, com pelo menos um dos pares de oligonucleotídeos, em 89% deles. Isso demonstra que ainda possa haver uma grande variedade de enzimas envolvidas na degradação de alcanos, não detectadas com esses oligonucleotídeos iniciadores específicos, já que os mesmos não são universais. Um resultado semelhante também foi relatado no trabalho de Cunha e colaboradores (2006), onde bactérias que foram capazes de degradar alcanos em ensaios de batelada não apresentaram amplificação com nenhum dos pares de oligonucleotídeo iniciadores, demonstrando que não são adequados para detecção desses genes em todos os gêneros.

Assim, ainda existe a possibilidade de que mais isolados desse trabalho possuam outras enzimas de degradação de alcanos, que ainda precisem ser mais bem investigadas; enzimas alcano hidrolisases conhecidas, mas cujos genes se localizam em plasmídeos ou que necessitem do uso de outros oligonucleotídeos iniciadores específicos para serem detectadas.

5.7) Avaliação da produção das enzimas esterases, lipases, hipóxido hidrolases e monooxigenases pela técnica de triagem de alto desempenho (HTS)

Os mesmos 70 isolados mencionados anteriormente foram avaliados quanto à presença de enzimas hidrolases e monooxigenases, com a utilização de sondas fluorogênicas. Lipases e esterases pertencem à classe das esterases, com o diferencial de a lipase ser uma esterase que atua em ésteres de cadeia longa derivados do glicerol, geralmente triglicerídeos. Assim, para a detecção da presença de enzimas esterases foi utilizada uma sonda para ésteres de cadeia curta (ES1) e para lipases uma sonda para ésteres de cadeia longa (LIP). Para detecção das enzimas epóxido hidrolases foram utilizadas duas sondas em ensaios diferentes, a sonda EP1 foi utilizada para a detecção das enzimas que atuam em epóxidos terminais e a sonda EP2 para a detecção das enzimas que atuam em epóxidos não terminais. Para detecção das enzimas monooxigenases do grupo das Baeyer-Villiger monooxigenases foram utilizadas também duas sondas em ensaios diferentes, a

sonda BV1 e a sonda BV3. Os resultados obtidos nas triagens enzimáticas estão listados na Tabela 7. Foram considerados como positivos quanto à produção de cada uma das enzimas os isolados cujo resultado de conversão das sondas no produto foi superior a 5 %.

Dentre os isolados bacterianos avaliados, 23 não apresentaram atividade para nenhuma das sondas testadas e 20 apresentaram atividades insignificantes para alguma delas (<5%), o que tornaria a aplicação prática das enzimas produzidas por eles pouco atrativa (Tabela 7). Os demais isolados apresentaram atividades distintas em relação às diferentes sondas, mas em geral a sonda para a qual o maior número de isolados apresentou atividade foi a LIP seguida da BV3, EP2, EP1 e ES1 e BVI (figura 13).

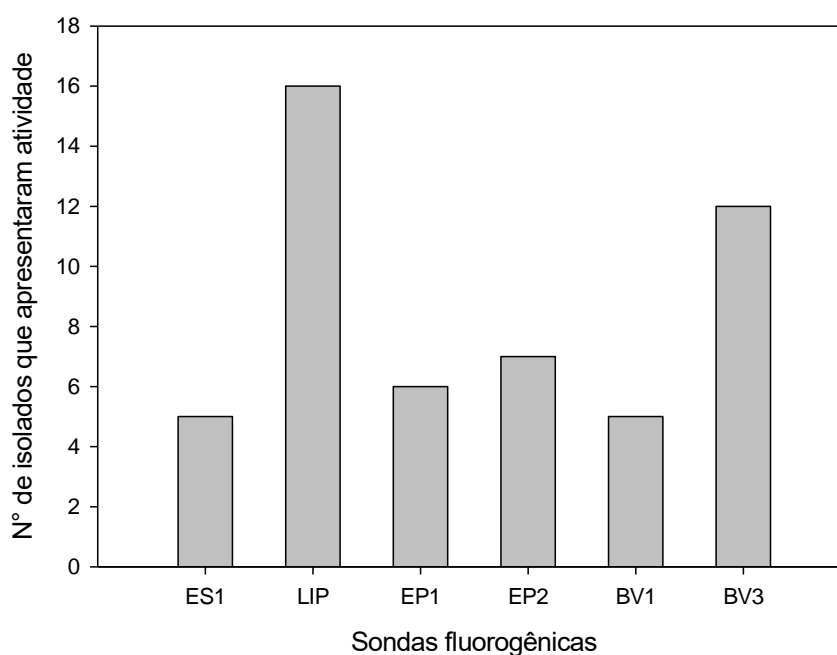


Figura 13: Número de isolados que apresentaram conversões enzimáticas significativas (acima de 5%) para cada uma das sondas fluorogênicas testadas. ES1-sonda para esterase; LIP-sonda para lipase; EP1-sonda para epóxidos terminais; EP2-sonda para epóxidos não terminais; BV1 e BV3- Sondas para difetentes Baeyer-Villiger monooxigenases

Os maiores valores de conversão enzimática também foram obtidos para a sonda de detecção de lipases. Dos 16 isolados que catalisaram a hidrólise desse composto,

12 apresentaram conversões superiores a 10% (LAPT 14, LAPER 62; *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *S. maltophilia* LAPM 53; *Acinetobacter junii* LAPM 30 e LAPM 41; *Alcaligenes sp.* LAPER 60; *Bacillus subtilis* LAPER 90 e LAPER 93, e *Bacillus sp.* LAPT 22, LAPEO 97 e LAPEO 100), sendo que os isolados *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27 e *S. maltophilia* LAPM 53 apresentaram valores particularmente altos, acima de 50% (74% e 50%, respectivamente). Dentre os 5 isolados que catalisaram a hidrólise de ésteres, 3 apresentaram conversões superiores a 10% (*Stenotrophomonas sp.* LAPM 27 e *Acinetobacter junii* LAPM 30, LAPM 41) (Tabela 7).

Dentre os 12 isolados bacterianos que apresentaram a atividade de Baeyer-Villiger monooxigenases detectadas pela sonda BV3, 5 apresentaram conversões superiores a 10% (LAPER 64; *Acinetobacter sp.* LAPER 54 e LAPER 61; *A. junii* LAPM 30 e LAPM 41) e dos 5 isolados que apresentaram a atividade de Baeyer-Villiger monooxigenases detectadas pela sonda BV1, 3 apresentaram conversões superiores a 10% (*Acinetobacter sp.* LAPER 61 e *A. junii* LAPM 30 e LAPM 41) (Tabela 7).

Dentre os 7 isolados que catalisaram a hidrólise de epóxidos não terminais, 4 apresentaram conversões enzimáticas superiores a 10% (*Stenotrophomonas maltophilia* LAPM 53 e *Bacillus sp.* LAPER 59, LAPEO 97 e LAPEO 103). Entretanto, nenhum dos isolados que catalisaram a hidrólise de epóxidos terminais apresentou conversões superiores a 10%, demonstrando que naturalmente a produção dessas enzimas nos isolados é muito baixa (Tabela 7).

Tabela 7: Conversões enzimáticas (%) das reações catalisadas pelo isolados selecionados utilizando sondas fluorogênicas para detecção das enzimas esterases, lipases, epóxido hidrolases e Baeyer-Villiger monooxigenases.

| Isolados | Sondas | | | | | |
|----------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | ES1 | LIP | EP1 | EP2 | BV1 | BV3 |
| LAPT 8 | 4 | - | 4 | - | - | - |
| LAPT 12 | - | - | 4 | - | - | - |
| LAPT 14 | - | 30 | 3 | - | - | 3 |
| LAPT 22 | 2 | 20 | - | 5 | - | - |
| LAPM 26 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 27 | 23 | 74 | 3 | - | - | - |
| LAPM 29 | - | - | 3 | - | - | - |
| LAPM 30 | 11 | 14 | - | - | 13 | 18 |
| LAPM 31 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 32 | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | |
|-----------|----|----|---|----|----|----|
| LAPM 33 | - | - | 4 | - | - | - |
| LAPM 34 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 36 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 37 | - | - | - | 2 | - | 2 |
| LAPM 38 | - | - | - | 2 | - | 2 |
| LAPM 40 | 3 | - | - | - | - | 2 |
| LAPM 41 | 15 | 15 | - | - | 37 | 47 |
| LAPM 42 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 43 | - | - | 3 | - | - | - |
| LAPM 44 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 45 | - | - | - | - | - | 2 |
| LAPM 46 | - | - | - | - | - | 2 |
| LAPM 48 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 50 | 3 | 2 | - | 2 | - | 7 |
| LAPM 52 | - | - | - | - | - | - |
| LAPM 53 | 3 | 50 | 2 | 17 | - | - |
| LAPER 54 | 2 | 4 | - | - | 5 | 11 |
| LAPER 55 | - | - | 4 | - | - | - |
| LAPER 56 | - | 2 | - | - | 2 | 8 |
| LAPER 57 | - | - | 2 | - | - | - |
| LAPER 58 | - | 2 | - | - | - | 7 |
| LAPER 59 | - | 4 | - | 11 | - | - |
| LAPER 60 | 2 | 11 | - | 2 | - | 6 |
| LAPER 61 | 8 | 5 | - | - | 10 | 11 |
| LAPER 62 | 3 | 36 | - | 3 | - | - |
| LAPER 63 | - | - | - | - | - | - |
| LAPER 64 | 6 | 4 | - | - | 6 | 13 |
| LAPER 66 | - | - | - | - | - | - |
| LAPER 67 | - | - | - | - | - | - |
| LAPER 68 | - | - | - | - | - | - |
| LAPER 72 | - | - | 4 | - | - | - |
| LAPER 73 | - | - | 5 | - | - | 2 |
| LAPER 88 | - | - | 2 | - | - | - |
| LAPER 89 | - | 7 | 2 | - | - | 7 |
| LAPER 90 | 2 | 20 | - | 3 | - | - |
| LAPER 93 | 4 | 40 | 5 | 6 | - | - |
| LAPER 94 | - | 8 | - | - | - | 9 |
| LAPEO 97 | 3 | 11 | 2 | 28 | - | - |
| LAPEO 99 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 100 | 2 | 40 | 3 | 5 | - | 8 |
| LAPEO 102 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 103 | 3 | 8 | 2 | 31 | - | - |
| LAPEO 104 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 105 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 107 | 2 | - | - | - | - | - |
| LAPEO 108 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 109 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 110 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 111 | - | 3 | 3 | - | - | - |
| LAPEO 112 | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|
| LAPEO 113 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 114 | - | - | - | - | - | - |
| LAPEO 115 | - | - | 3 | - | - | - |
| LAPEO 116 | - | - | 7 | - | - | - |
| LAPEO 117 | - | - | 3 | - | - | - |
| LAPEO 118 | - | - | 8 | - | - | 2 |
| LAPEO 119 | - | - | 6 | - | - | 4 |
| LAPEO 121 | - | - | 6 | - | - | - |
| LAPEO 123 | - | - | 4 | - | - | - |
| LAPEO 124 | - | - | 4 | - | - | - |

Legenda: Sondas ES1 (ésteres se cadeia curta), LIP (ésteres de cadeia longa), EP1 (epóxidos terminais), EP2 (epóxidos não terminais), BV1 e BV3 (Baeyers-Villigers monooxigenases)

Os isolados bacterianos que mais se destacaram quanto à produção de hidrolases e monooxigenases, por apresentarem resultados de conversões enzimáticas acima de 10%, valor que embasa a continuidade de estudos e otimização de produção, para pelo menos duas enzimas diferentes foram o *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27 (para esterases e Lipases); *Acinetobacter junii* LAPM 30 e LAPM 41 (para todas as enzimas com exceção dos epóxidos); *S. maltophilia* LAPM 53 (para lipases e epóxidos não terminais); *Acinetobacter sp.* (para Baeyers-Villigers monooxigenases dos grupos 1 e 3) e *Bacillus sp.* LAPEO 97 (para lipases e epóxidos não terminais). Bactérias isoladas de ambientes contaminados normalmente apresentam mais de uma atividade enzimática combinada, o que possibilita a hidrólise de substratos orgânicos contendo várias substâncias complexas (SANOMYA & NAHAS, 2003).

Todas essas enzimas de origem biológica são extensivamente exploradas em biocatálises industriais e a demanda mundial por elas tem crescido anualmente. Por isso, estudos para a descoberta de novos micro-organismos produtores e a otimização de sua produção para aplicação industrial é alvo de extensas pesquisas (WARNER *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006). Adicionalmente o uso das mesmas em biocatálises ambientais vem ao encontro de uma forte tendência dos governos atuais em intensificar as restrições à poluição ambiental (GUPTA *et al.*, 2004).

Lipases e esterases apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem óleos e gorduras produzindo ácidos graxos e glicerol, principalmente as lipases, que atuam em acilgliceróis de cadeia longa. Assim, o uso dessas enzimas pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura; e sua utilização reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, consideravelmente (CAMMAROTA & FREIRE, 2006).

Lipases são enzimas ubíquas na natureza, produzidos por várias plantas, animais e micro-organismos. As lipases de origem microbiana, produzidas por bactérias e fungos representam a classe de enzimas mais utilizada em aplicações biotecnológicas e de química orgânica, tais como remoção de material hidrofóbico da madeira em indústrias de papel e celulose, tratamento de efluentes e hidrólise seletiva de triacilgliceróis com liberação de ácidos graxos que atuam como flavorizantes em produtos alimentícios, dentre outros (PADILHA *et al.*, 2011). Alguns gêneros bacterianos comumente relatados como produtores dessa enzima são *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e embora o número de micro-organismos produtores disponíveis seja alto, apenas alguns são explorados comercialmente como cepas selvagens ou recombinantes (JAEGER *et al.* 1994; PALEKAR *et al.*, 2000). Destas, as mais importantes são as lipases produzidas por bactérias do gênero *Pseudomonas*, amplamente utilizadas em várias das aplicações biotecnológicas já mencionadas (JAEGER *et al.*, 1994.; PANDEY *et al.*, 1999; BEISSON *et al.*, 2000).

No gênero *Bacillus*, mais de dez espécies diferentes já foram relatadas como produtoras de lipases (GUPTA *et al.*, 2004). Dentro do gênero *Acinetobacter* as espécies relatadas até então como produtoras dessa enzima são *A. calcoaceticus* (PANDEY *et al.*, 1999) e *A. radioresistens* (LIU & TSAI, 2003), não sendo encontrados relatos de sua produção pela espécie *A. junni*. Há poucos relatos da produção de lipases por bactérias do gênero *Stenotrophomonas* e um deles é um trabalho de Ben-Bem-Gigirey e colaboradores (2010), que observaram a produção de dessa enzima por um isolado de *S. maltophilia*. Ressalta-se que para os isolados nos quais a produção dessa enzima é detectada, o processo pode ser otimizado, pois é comumente relatado que o rendimento da produção de lipases microbianas está relacionado à fonte de carbono e nitrogênio utilizada, períodos de incubação das culturas, temperatura utilizada entre outros, sendo que as condições ótimas variam entre os isolados (GUPTA *et al.*, 2004).

A aplicação de um processo de pré-tratamento do efluente com adição de enzimas hidrolíticas e CAS, já mencionados, pode facilitar a biodegradação desse material por dissolver gorduras e óleos, melhorando a degradação biológica do efluente e acelerando o processo como um todo (KNEZEVIC *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1997). Há relatos de pesquisa e patentes do uso de micro-organismos e esses produtos obtidos

por processos otimizados em laboratório para o tratamento biológico de efluentes com elevado teor de gordura e de óleo (CAMMAROTA & FREIRE 2006). Mendes e colaboradores (2005) descreveram o uso de uma mistura composta por microorganismos, agentes emulsionantes e enzimas (protease, amilase, lipase, celulase e pectinase) para a remoção de lípidos em águas residuárias produzidas pela limpeza de máquinas industriais, que foi eficiente em remover quase todo o óleo.

5.8) Produção e caracterização parcial dos Compostos Ativos de Superfície produzidos pelas bactérias.

Como discutido anteriormente, alguns dos isolados que proporcionaram os melhores resultados de redução da tensão superficial foram o *Bacillus subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp* LAPER 94, quando crescidos em meio mineral suplementado com glicose, sendo selecionados para ensaios de caracterização química.

5.8.1) Extração alcoólica dos Compostos Ativos de Superfície

Foi possível extrair compostos tensoativos para todos os três isolados avaliados com o uso de etanol, confirmado pela avaliação da atividade emulsificante e surfactante dos extratos, entretanto o rendimento variou entre eles. O rendimento de *B. subtilis* LAPER 90 foi o maior dos três e correspondeu a 1,85 g L⁻¹. Para os isolados *B. subtilis* LAPER 93 e *Alcaligenes sp* LAPER 94, o rendimento foi de 0,95 g L⁻¹ e de 1,1 g L⁻¹ respectivamente.

Alguns trabalhos que avaliaram a produção de compostos tensoativos por *B. subtilis* obtiveram rendimentos menores que os obtidos nesse trabalho. Jing e colaboradores (2011) obtiveram rendimentos máximos de 0,26 g L⁻¹ e 0,32 g L⁻¹ para o isolado de *B. subtilis* JÁ-1, após cultivá-lo em meio com glicose como fonte de carbono, incubado a 30 °C e 40 °C, respectivamente. Entretanto, por outro lado em alguns estudos de otimização da produção de biossurfactantes por isolados dessa espécie há o relato de rendimentos da produção de biossurfactantes maiores. Nitschke & Pastore (2006), por exemplo, relataram uma produção máxima correspondente a 3 g L⁻¹ para *B. Subtilis* LB5a a partir de resíduos da produção de mandioca, substrato rico em carboidratos, como fonte de carbono.

Poucos trabalhos investigam a produção de CAS por bactérias do gênero *Alcaligenes*, o que demonstra a relevância dos dados obtidos nesse estudo. Destaca-se que o rendimento obtido para o isolado *Alcaligenes sp.* LAPER 94, de 1,1g L⁻¹, foi maior do que o obtido por muitos trabalhos de investigação da produção de CAS para outros gêneros bem relatados quanto à produção dessas moléculas, como *Pseudomonas sp.* (PATEL & DESAI.,1997; DUBEY &JUWARKAR., 2001).

5.8.2) Caracterização parcial da composição química dos biossurfactantes

Os compostos tensoativos dos isolados *B. subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp.* LAPER 94 foram caracterizados quanto à concentração de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os resultados indicam uma variação na presença de carboidratos totais, de 8,79% a 50,40%, de proteínas de 3,08% a 38,52% e de lipídeos de 16% a 40% (tabela 8).

A variação da composição química reflete a diversidade estrutural conhecida dos compostos tensoativos que são classificados principalmente por sua composição química em classes, cujas principais são glicolipídeos; lipopolissacarídeos; lipopeptídeos e lipoproteínas; fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (ZAJIC & SEFENS, 1984; DESAI & BANAT, 1997).

Há uma variedade de lipopeptídeos estruturalmente diferentes produzidos por várias espécies de *Bacillus* que possuem grande potencial de aplicações biotecnológicas e biofarmacêuticas, tais como surfactina, fengicina, lichesina, iturina, pumilacidina e bacillomicina (BARROS *et al.*, 2007).

No caso de *B. subtilis*, os lipopeptídeos excretados podem ser divididos em três famílias compostas por peptídeos cíclicos com diferentes estruturas: surfactina, iturina e fengicina (DELEU *et al.* 1999; VATER *et al.*, 2002; RUGGERI *et al.*, 2009). Entre os principais tipos de biossurfactantes produzidos por *B. Subtilis*, a surfactina é um dos mais eficientes, pois em concentrações menores que 20 μmol L⁻¹ é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹ (WEI *et al.*, 2003). Apenas as espécies *B. subtilis* e *B. pumilus* foram relatadas como produtores de surfactina (BANAT *et al.*, 2000).

A composição do biossurfactante produzido pelo isolado de *B. subtilis* LAPER 90 foi predominantemente de proteínas (38,52%) e lipídios (26%) (Tabela 8) e sugere que o biossurfactante produzido por ele seja um lipopeptídio, entretanto ainda é

necessária a purificação do biossurfactante e caracterização da massa e de grupamentos químicos, para a definição de a qual família lipopeptídica ele pertenceria.

Normalmente diferentes gêneros de micro-organismos sintetizam classes estruturalmente diferentes de CAS, enquanto estirpes pertencentes à mesma espécie produzem CAS semelhantes estruturalmente (RUGGERI *et al.*, 2009). Pôde-se observar nesse trabalho, no entanto, que o biossurfactante produzido por outro isolado de *B. subtilis* investigado (LAPER 93) apresentou uma composição diferente, pois apesar de ter apresentado uma proporção alta de proteínas (22,83%) e lipídeos (33%) houve uma predominância de carboidratos (41,38%) (Tabela 8). Isso é atípico para a espécie, entretanto há outros trabalhos que também obtiveram composições de biossurfactantes produzidos por isolados de *B. subtilis* semelhantes à nossa. Calvo e colaboradores (2006), ao caracterizar o biossurfactante produzido por uma isolado dessa espécie obtiveram uma composição de 33,87% de carboidratos e 14,09% de proteínas. Assim, a composição do biossurfactante desse isolado também precisa ser confirmada e melhor investigada, podendo ter ocorrido, ainda, a contaminação do extrato por biomoléculas presentes no sobrenadante da cultura.

Um número maior de pesquisas ainda são necessárias para melhor caracterizar a composição dos CAS produzidos pelo gênero *Alcaligenes* (BHARALI *et al.*, 2011). As principais informações que se tem até o momento é a de possuem altas concentrações de carboidratos e lipídeos, apesar de alguns trabalhos relatarem também a observação de altas concentrações de proteínas. No trabalho de Calvo e colaboradores (2006), o CAS produzido por uma linhagem de *A. faecalis*, apresentou 51% de carboidratos e 44,1%, sendo caracterizado como glicopeptídeo, já no trabalho de Bharali e colaboradores (2011) o CAS produzido por outra linhagem da mesma espécie apresentou 29% de carboidratos e 76% de lipídeos, sendo caracterizado como glicolipídeo. O CAS produzido pelo isolado de *Alcaligenes sp.* LAPER 94, apresentou composição predominante de carboidratos (50,40%) e lipídeos (40%) em detrimento de proteínas (3,08%) (Tabela 8), o que sugere que ele pertença a classe de glicolipídeos, apesar de também precisar ser melhor caracterizado.

Tabela 8: Caracterização parcial dos CAS produzidos por três isolados selecionados, quanto à composição de carboidratos totais, proteínas e lipídeos.

| Isolados | Composição (%) | | |
|---------------------------------------|----------------|-----------|----------|
| | Carboidratos | Proteínas | Lipídeos |
| LAPER 90 (<i>Bacillus subtilis</i>) | 8,79 | 38,52 | 26,00 |
| LAPER 93 (<i>Bacillus subtilis</i>) | 41,28 | 22,83 | 33,00 |
| LAPER 94 (<i>Alcaligenes sp.</i>) | 50,40 | 3,08 | 40,00 |

5.8.3) Determinação da atividade emulsificante em diferentes substratos hidrofóbicos

As atividades emulsificantes dos extratos dos CAS dos isolados *B. subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp.* LAPER 94 frente a diferentes fases orgânicas estão representados nas figuras (14 a), (14 b) e (14 c), respectivamente. De forma geral, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a média de resultados totais de emulsificação obtidos pelos CAS dos três isolados. Entretanto, considerando-se individualmente cada CAS houve variação significativa quanto à capacidade de emulsionar os compostos hidrofóbicos utilizados (Anexo 9).

O CAS produzido por *B. subtilis* LAPER 90 apresentou maior atividade emulsificante quando foi usado o óleo lubrificante (aproximadamente 80%). Para os combustíveis querosene, xileno, tolueno e hexano, as atividades foram próximas de 60%, sem diferenças significativas entre elas ($p < 0,05$). Para o hexadecano a atividade foi de 54% e a menor atividade foi obtida pelo uso do óleo diesel (7,5%) (14 a). O CAS produzido pelo isolado *B. subtilis* LAPER 93 apresentou valor de atividade emulsificante alta e estatisticamente idêntica para os combustíveis querosene, xileno, tolueno, hexano, óleo lubrificante e óleo diesel (>50%). Entretanto, não emulsificou bem o hexadecano (aproximadamente 25%) (14 b). O CAS produzido pelo isolado *Alcaligenes sp.* LAPER 94 apresentou altas atividades para todos os compostos testados (> 40%), sendo o maior valor de atividade emulsificante observado quando foi utilizado o óleo lubrificante (aproximadamente 77%) (14 c).

Vários estudos tem mostrado que CAS podem variar quanto a sua capacidade de emulsificar diferentes compostos hidrofóbicos, o que está principalmente relacionado à composição diferenciada de hidrocarbonetos nesses combustíveis (BENINCASA *et al.*, 2002). Mas de modo geral pôde-se observar uma alta atividade emulsificante dos CAS obtidos. Isso é muito interessante porque além de atividade surfactante, a propriedade de promoverem bons índices de emulsificação também é crítica para

essas biomoléculas serem utilizadas em diferentes ambientes e aplicações industriais, inclusive na biorremediação de áreas contaminadas com diferentes combustíveis (BANAT *et al.*, 2000; DASTGHEIB *et al.*, 2008).

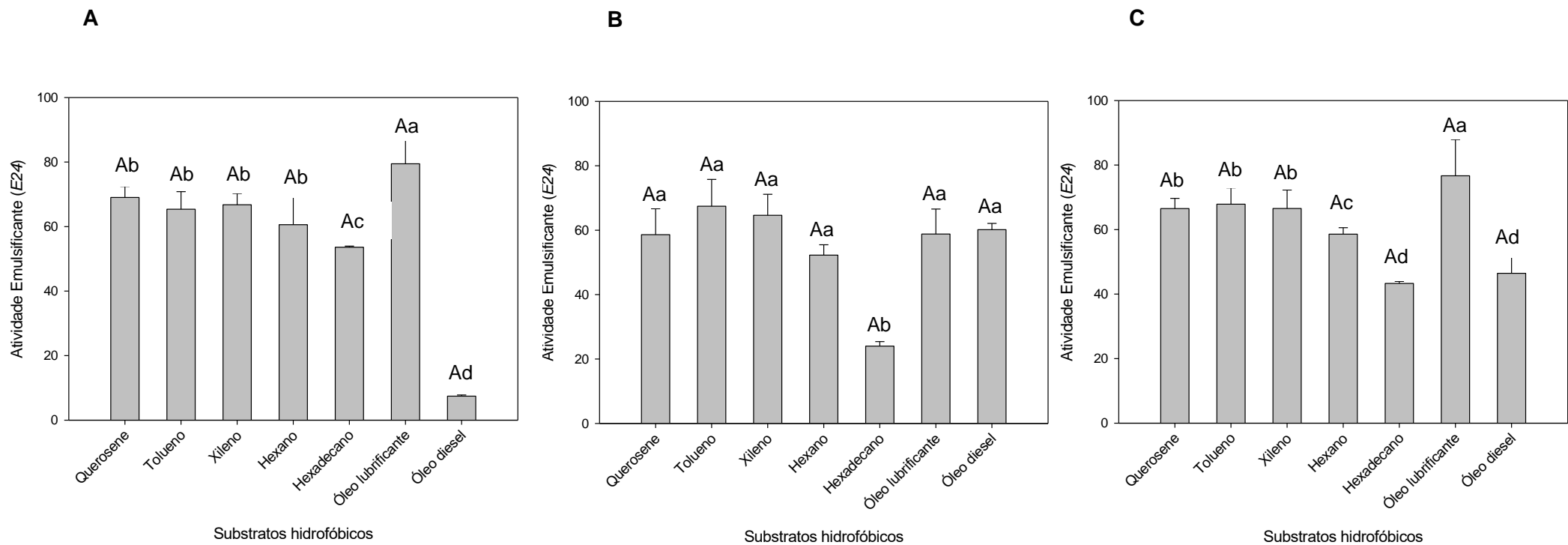


Figura 14: Atividade emulsificante dos compostos tensoativos produzidos pelos isolados (A) *B. subtilis* LAPER 90; (B) *B. subtilis* LAPER 93; (C) *Alcaligenes* sp. LAPER 94 na concentração de 5 mg mL⁻¹, utilizando diferentes compostos hidrofóbicos. Atividade emulsificante expressa pelo índice de emulsificação (E24). Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nos três gráficos e pelas mesmas letras minúsculas individualmente em cada gráfico foram consideradas estatisticamente iguais pelo teste de Tukey com nível mínimo de significância de 0,05.

5.9) Avaliação da biodegradação do efluente oleoso em meio líquido

Nos ensaios de biodegradação foram avaliados dez isolados que apresentaram resultados satisfatórios quanto ao crescimento em petróleo bruto ($DO_{600} > 0,4$) e/ou presença de enzimas degradativas e produção de CAS (Tabela 9). A eficácia de degradação do petróleo bruto pelos isolados selecionados foi investigada por meio de ensaios gravimétricos.

Dentre os isolados avaliados, LAPER 62, LAPEO 116; *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *A. junii* LAPM 30 e *Alcaligenes sp.* LAPER 60 apresentaram reduções superiores a 37% na quantidade de óleo, em relação ao controle, com destaque para o isolado *A. junii* LAPM 30 que foi capaz de remover mais de 90% do óleo (Tabela 9).

Tabela 9: Remoção de óleo proporcionada pelo isolados (%).

| Isolado | Redução de óleo (%) |
|-------------------------------------|---------------------|
| <i>Stenotrophomonas sp.</i> LAPM 27 | 42 |
| <i>Acinetobacter junii</i> LAPM 30 | 90 |
| LAPM 38 | 14 |
| LAPM 42 | 5,1 |
| <i>Acinetobacter sp.</i> LAPER 54 | 7,7 |
| <i>Alcaligenes sp.</i> LAPER 60 | 37 |
| LAPER 62 | 55 |
| LAPER 64 | 55 |
| <i>Enterococcus sp.</i> LAPER 66 | 11 |
| LAPEO 116 | 40 |

Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos vêm sendo vastamente estudadas desde a década 80 e pesquisas visando a aplicação desses isolados vem aumentando e ganhando cada vez mais destaque desde então. Vários são os gêneros conhecidos como bons degradadores, entre eles *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacterium*, *Xanthomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Bacillus* (ATLAS 1984; BARTHA 1986). Entretanto, as pesquisas mostram que uma única espécie de micro-organismo dificilmente degrada completamente todos os hidrocarbonetos de uma fração de combustível. As maiores taxas de degradação

vem sendo obtidas por consórcio de micro-organismos obtidos por enriquecimento (JUHASZ *et al.*, 2000a; BERRY *et al.* 2006).

O gênero *Stenotrophomonas* tem sido isolado de ambientes contendo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo que linhagens da espécie *S. maltophilia* são as mais estudadas por ser descrita sua eficiência na degradação de vários desses hidrocarbonetos (MOLINA *et al.*, 2009). Estudo realizado por Juhasz e colaboradores (2000b) mostrou que uma linhagem de *S. maltophilia* isolada de solo contaminado com óleo foi capaz de degradar todos os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos avaliados, apresentando redução de 90% do fluoreno, 91% do fenantreno, e 74% de pireno e fluoranteno após 42 dias de incubação.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* são ubíquas na natureza e capazes de utilizar uma grande variedade de hidrocarbonetos, inclusive os aromáticos, e por isso vem atraindo cada vez mais atenção, para sua aplicação tanto ambiental quanto biotecnológica (YUSTE *et al.* 2000; CAPELLO *et al.*, 2012). Neste trabalho um isolado da espécie *A. junni* mostrou um excelente resultado quanto à remoção de óleo (mais de 90%) e superior a maioria dos trabalhos já descritos. Perfil semelhante foi observado em um estudo de Capelo e colaboradores (2012) no qual isolados do gênero *Acinetobacter* foram capazes de degradar mais de 75% de óleo bruto após crescimento por 8 dias em meio suplementado com (1%), sendo que a remoção da fração alifática foi de mais de 90%. Basuki e colaboradores (2011) realizaram o isolamento de bactérias de solo contaminado com óleo lubrificante, após submeter as amostras ao enriquecimento com o mesmo combustível. As maiores porcentagens de remoção de óleo avaliadas por ensaio gravimétrico, após 14 dias de incubação, foram observados para uma linhagem de *A. junni*. A maior parte dos hidrocarbonetos constituintes do combustível de cadeia curta (C<9) e longa (C>25), foram totalmente consumidos, além de muitos componentes de cadeia média (C10-C24).

Bactérias do gênero *Alcaligenes* tem mostrado capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, mas a maior parte dos estudos com isolados desse gênero vem sendo realizado com os mesmos em consórcio com isolados de outros gêneros. Khanna e Lal (1996) investigaram a degradação de frações leves e pesadas de óleo cru por uma linhagem de *A. calcoeticus* e *A. odorans* separadamente e em conjunto. Separadamente, *A. calcoeticus* degradou 50% do

óleo leve e 45% do óleo pesado, predominantemente a fração de compostos alifáticos. *A. odorans* degradou 29% do óleo leve e 37% do óleo pesado, com degradação similar das frações alifáticas e aromáticas. Quando essas duas cepas foram associadas o consórcio foi capaz de aumentar a degradação das duas frações de óleo, para 58% no caso do óleo leve e para 40% no caso do óleo pesado. Plaza e colaboradores (2008) também observaram efeito positivo do uso associado de 2 bactérias isoladas de lodos ativado, *A. piechaudii*, e *Ralstonia picketti*. Foi observada uma redução na concentração de HTP em mais de 90% após 30 dias de incubação, sendo que mais de 30% de redução ocorreu nos 3 primeiros dias.

Micro-organismos com habilidade em utilizar hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados em áreas poluídas ou áreas que não tiveram contato prévio com esses poluentes. Entretanto, a quantidade de micro-organismos que apresentam essa habilidade geralmente é maior no local que foi impactado. Além disso, nas áreas expostas a esses poluentes, a condição de estresse pode selecionar melhores linhagens com habilidade em degradar tais compostos e que possua um maior número de enzimas degradativas (ROSATO *et al.*, 1997; SINGH & LIN, 2008). Muitos dos micro-organismos capazes de crescer e degradar compostos oleosos nesses ambientes contaminados produzem compostos ativos de superfície (PLAZA *et al.* 2006, RON & ROSENBERG., 2002). Esta propriedade é considerada como uma estratégia biológica para facilitar a disponibilidade desses substratos hidrofóbicos (RON & ROSENBERG., 2002).

A possibilidade de isolar bactérias naturalmente presentes nesses sistemas contaminados e identifica-las e caracteriza-las quanto sua eficácia na utilização de hidrocarbonetos em escala de bancada é muito importante devido à possibilidade de aplicação desses isolados posteriormente em processos de biorremediação *in situ* (PLAZA *et al.*, 2008; CAPELLO *et al.*, 2012).

6. CONCLUSÕES

- A população total da amostra foi da ordem de 10^6 NMP mL⁻¹ e a população de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos dos combustíveis óleo lubrificante, querosene e parafina foram da ordem de 10^5 , 10^4 , e 10^3 NMP mL⁻¹, o que correspondeu respectivamente a 1,77%, 0,127% e 0,068% do total.
- A diversidade metabólica da comunidade foi alta, com consumo de 30 das 31 fontes de forma expressiva nas primeiras 48 horas. Considerando-se os grupos de compostos nos quais essas fontes se agrupam determinou-se que velocidade de utilização dos carboidratos > aminoácidos > polímeros > ácidos carboxílicos > aminas/amidas > compostos fenólicos.
- O isolamento por meio do plaqueamento direto da amostra, plaqueamento de alíquotas de poços positivos quanto ao crescimento nas microplacas utilizadas nos ensaios para quantificação de bactéria degradadoras de hidrocarbonetos e a partir do enriquecimento em meio mineral e BHI, suplementados com óleo bruto e recuperado da ETEI, foi suficiente para a obtenção de 112 isolados.
- Após a identificação dos isolados os gêneros observados foram predominantemente *Bacillus* sp. além de *Rhodococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Leucobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Acinetobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp., *Alcaligenes* sp., *Enterococcus* sp. e *Kerstersia* sp. A frequência relativa desses gêneros variou em cada um dos métodos de isolamento utilizados e a diversidade de gêneros obtidos pelo plaqueamento direto foi a menor das três.
- A fonte de carbono afetou tanto o crescimento quanto a produção de CAS com atividade emulsificante/surfactante. De modo geral as maiores médias de crescimento e produção foram obtidas com a utilização da glicose como fonte de carbono, mais muitos isolados cresceram bem e produziram CAS quando crescidos em óleo.

- Os isolados mais promissores quanto à produção de emulsificantes foram LAPER 58; *Staphylococcus sp.* LAPT 5; *Chryseobacterium joostei* LAPM 34; *Enterobacter cloacae* LAPM 43 e LAPM 52; *Acinetobacter sp.* LAPER 54, *Ochrobactrum sp.* LAPEO 112 que apresentaram índices de emulsificação superiores a 70%. Os isolados mais promissores quanto à produção de surfactantes foram *O. intermedium* LAPM 28 e *Bacillus sp.* LAPEO 107, que apresentaram espalhamento da gota acima de 1,8 cm e *B. subtilis* LAPER 90 e LAPER 93; *Alcaligenes sp.* LAPER 94 e *Bacillus sp.* LAPM 39 que permitiram a obtenção de tensões superficiais abaixo de 35,0 mN m⁻¹.

- Foi possível detectar a presença de atividade das enzimas catecol 1,2-dioxigenase em 8 isolados e de alcano hidroxilases dos grupos II e III em 10 e 14 isolados, respectivamente. A presença de atividade de esterases, lipases, epóxido-hidrolases terminais, epóxido hidrolases não terminais, Baeyer-Vileger monooxigenases dos grupos 1 e 3 foi detectada em 5, 16, 6, 7, 5, e 12 isolados, respectivamente, sendo que os maiores valores de conversão enzimática foram obtidos para a sonda de detecção de lipases.

- Os CAS produzidos pelos isolados *B. subtilis* LAPER 90 e LAPER 93 e *Alcaligenes sp.* LAPER 94 apresentaram rendimentos de 1,85 g L⁻¹, 0,96 g L⁻¹ e 1,1 g L⁻¹ respectivamente, e demonstraram alta capacidade de emulsificação, cuja média de forma geral não variou entre eles, frente à diferentes compostos hidrofóbicos.

- Os seis isolados mais promissores até o momento quanto à degradação de hidrocarbonetos são LAPER 64, LAPEO 116; *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27; *Acinetobacter junii* LAPM 30 e *Alcaligenes sp.* LAPER 60, pois demonstraram capacidade de remoção de óleo em meio mineral suplementado com essa fonte, a partir de ensaios gravimétricos, que variou de 37% a 90%, sendo que o isolado *A. junii* LAPM 30 foi o responsável pela maior porcentagem de remoção.

- Foi possível obter muitos isolados que se mostraram promissores tanto em relação à obtenção de produtos de interesse industrial quanto à utilização em processos de biorremediação, sendo que alguns deles como *Stenotrophomonas sp.* LAPM 27 e

Acinetobacter jnnii LAPM 30 e LAPM 41 apresentaram a produção da maioria dos compostos para o quais foram avaliados e bons resultados de crescimento e/ou degradação de óleo, o que pode ainda ser otimizado em trabalhos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, p. 143–151, 2008.
- ABRAHAM, J.; KUMARI, M. Biodegradation of diesel oil using yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Research Journal of Environmental Toxicology*, v. 5, p. 369-377, 2011.
- ADESODUN, A.; MBAGWU, J.S.C. Distribution of heavy metals and hydrocarbon contents in an alfisol contaminated with waste-lubricating oil amended with organic wastes. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3195 – 3204, 2008.
- AECKERSBERG, F.; BAK, F.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives in Microbiology*, v. 156, p. 5–14, 1991.
- AL-READHWAN, S.A.; CRITTENDEN B.D.; LABABIDI, H. M. S. “Wastewater minimization under uncertain operational conditions”. *Computer and Chemical Engineering*, v. 29, p. 1009-1021, 2005.
- ALLARD, A.S.; NEILSON, A.H. Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 39, p. 253-285, 1997.
- ALTSCHUL, S.F. GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuclei Acids Research*, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, v. 35, p. 17-43, 2010.
- ASSINDER, S. J.; WILLIAMS, P.A. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Advances in Microbial Physiology*, v. 31, p. 1–69, 1990.
- ASTURIASL, J.A.; ELTIS, L.D.; PRUCHA, M.; TIMMISN, K.N. Analysis of Three 2,3 Dihydroxybiphenyl 1,Z-Dioxygenases Founind *Rhodococcus globerulus* P6 identification a new family of extradiol dioxygenases. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1994.
- ATLAS, R. M. (ed.) *Petroleum Microbiology*. 683 pp. Macmillan, NY, 1984.
- ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin Oxford*, v. 31, p. 178-182, 1995.
- BADIS, A.; FERHAT, S.; MNIF, S.; EDDOUAOUA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium*

sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 1182-1188, 2011.

BAGAJEWICZ, M. A review of recent design procedures for water networks in refineries and process plants”, *Computers and Chemical Engineering*, v. 24, p. 2093-2113, 2000.

BAKER, K.H.; HERSON, D.S., *Microbiology and Biodegradation*. USA, cap. 2, p. 11-60, 1994.

BAKER, S.C.; CHEN, C-Y.; DARTON, R.C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *Journal of Microbiological Methods*, v. 70, p. 503–510, 2007.

BANAT, I.M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environmental International*, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, p. 409-414, 2007.

BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*, v. 12, p. 155–172, 1986.

BASUKI, W.; SYAHPUTRA, K.; SURYANI, A.T.; PRADIPTA, I. Biodegradation of Used Engine Oil by *Acinetobacter junii* TBC 1.2. *Indonesian Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 132-138, 2011.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.; AMORIM, F.R.; TOTOLA, M.R.; Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 868–875, 2006.

BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; MICHON, Q.; GARRIGUES, P.; BURGEOT, P.; BELLOCQ, J. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and sediments records. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, v. 47, p. 77-99, 1998.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipid by yeast. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 15–18, 2004.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIERE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 102, p. 133-153, 2000.

- BEN-GIGIREY, B.; VIEITES, J. M.; VILLA; T. G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. *International Journal of Food Microbiology*, v. 57, p. 19-31, 2000.
- BENEDEK, T.; MÁTHÉ, I.; TÁNCSICS, A.; MÁRIALIGETI, K.; ALBERT, B.; LÁNYI, S. Intrinsic bioremediability of petroleum hydrocarbon contaminated sites in Romania: Diversity of bacterial community, catechol dioxygenase and alkane-monooxygenase genes. *Buletin Stiintific – Universitatea Politehnica din Bucuresti, Series B*, v. 73, 2011.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; GAYLARDE, C.C. Biosurfactantes. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (eds) *Microbiologia Ambiental*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, pp 151–184, 2008.
- BERRY, C.J.; STORY, S.; ALTMAN, D.J.; UPCHURCH, R.; WHITMAN, W.; SINGLETON, D.; PŁAZA G.; BRIGMON, R.L. Biological treatment of petroleum in radiologically contaminated soil. In: Clayton, J. Clark II, Lindner, A.S (eds) *Remediation of hazardous waste in the subsurface. Bridging flask and field*. American Chemical Society, Washington, DC, p 87, 2006.
- BESSION, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*. Evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnology Letters*, v.14, p. 1013–1018, 1992.
- BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B.K.; THAKUR, A.J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, p. 682-690, 2011.
- BINET, P.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 2011–2017, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Um método rápido para a extração total de lipídeos e de purificação. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BODOUR, A.A.; DREES, K.P.; MAIER, R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 6, p. 3280–3287, 2003.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 63-67, 2000.
- BRIONES, A. Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft Excell. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 272-280, 1999.

CALDWELL, D.R. Microbial physiology and metabolism. 2nd ed. Belmont: Star, 2000. 403p

CAIRNS, L.; COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E.; WOOD, J.; KOSARIC, N. Characterization of *Nocardia amarae* as potent biological coalescing agent of water-in-oil emulsions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, p. 362-366, 1982.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LOPEZ, J. Surfactant activity of naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, v. 109, p. 255–262, 2004

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

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GARCÍA FANDIÑO, C.; LAGUNA, J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1493–1501, 2008.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; RAMOS, S. A. F.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS-JUNIOR, M. A.; LIMA-FILHO, J. L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.191-194, 2003.

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, v. 8, p. 16, 2009.

CAMERON, D.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1420-1422, 1988.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2195–2210, 2006.

CANIZARES, P.; MARTÍNEZ, F.; LOBATO, J.; RODRIGO, M.A. Break-up of oil-in-water emulsions by electrochemical techniques. *Journal of Hazardous Materials*, v. 145, p. 233-240, 2007.

CAPPELLO, S.; SANTISI, S.; CALOGERO, R.; HASSANSHAHIAN, M.; YAKIMOV, M.M. Characterisation of Oil-Degrading Bacteria Isolated from Bilge Water. *Water Air Soil Pollut*, v. 223, p. 3219–3226, 2012.

CAPPS, R.W.; METELLI, G.N.; BRADFORD, M.L. Reduce oil and grease content in wastewater. *Hydrocarbon Processing*, p. 102-110, 1993.

CARLÓN, R.P.; JOURDAIN, N.; REYMOND, J.L. Fluorogenic polypropionate fragments for detecting stereoselective aldolases. *Chemistry - A European Journal*, v. 6, p. 4154-4162, 2000.

CASTRO, S.P. Avaliação da aplicabilidade de processos biológicos no tratamento de efluentes oleosos com elevada carga orgânica. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual da Paraíba, 2009.

CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH, E.B.; MABONI, F.; CAMARGO, F.A.O.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1203–1222, 2012.

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

CHAUHAN, A.; FAZLURRAHMAN; OAKESHOTT, J.G.; JAIN, R.K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 95–113, 2008.

CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil-water emulsion. *Processing Technology*, v. 86, p. 199-508, 2005.

CHEN, L.S. Triagem de alto desempenho na detecção de atividade de epóxido-hidrolases e monooxigenases utilizando células íntegras. Dissertação (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CHENG, Q.; THOMAS, S.M.; ROUVIÈRE, P. Biological conversion of cyclic alkanes and cyclic alcohols into dicarboxylic: biochemical and molecular basis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 704-711, 2002.

CHERYAN, M.; RAJAGOPALAN, N. Membrane processing of oily streams wastewater treatment and waste reduction. *Journal of Membrane Science*, v. 151, p. 13-18, 1998.

CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C.; ICHIAKOR, O. Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 2541-2544, 2009.

CHOI, K-H.; DOBBS, F.C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, v. 36, p. 203–213, 1999.

CHOPADE, B.A.; SATPUT, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 436-450, 2010.a

CHOPADE, B.A.; SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, p. 127–144, 2010.b

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 302-307, 1997.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Gestão de resíduos e produtos perigosos. Resolução 362, 23 junho 2005.

COON, M.J. Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, p. 378-385, 2005.

COOPER, D.G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*, v. 3, p. 145–149, 1986.

CRAVO-LAUREAU, C.; HERNANDEZ-RAQUET, G.; VITTE, I.; JEZÉQUÉL, R.; BELLET, V.; GODON, J-J.; CAUMETTE, P.; BALAGUER, P.; DURAN, R. Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 888-895, 2011.

CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 45-49, 2000.

CUNHA, C.D.; ROSADO, A.S.; SEBASTIÁN, G.V.; SELDIN, L.; VON DER WEID, I. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p. 949–959, 2006.

DAGAUT, P.; CATHONNET, M. The ignition, oxidation, and combustion of kerosene: A review of experimental and kinetic modeling. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 32, p. 48–92, 2006.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1191–1199, 2007.

DASTGHEIB, S.M.M.; AMOOZEGAR, M.A.; ELAH, E.; ASAD, S.; BANAT, I.M. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 263-270, 2008.

DAVIS, C.; CORT, T.; DAÍ, D.; ILLANGASEKARE, T.H. MUNAKATA-MAR. Effects of heterogeineity and experinmental scale on the biodegradation of diesel. *Biodegradation*, v. 14, p. 373-384, 2003.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H. ; POPINEAU, Y. ; JACQUES, P. ; THONART, P. ; PAQUOT, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p. 3-10, 1999.

- DEMAIN, A.L. Industrial Microbiology. *Science*, v. 214, p. 987-994, 1981.
- DEMIRJIAN, D.C.; SHAH, A.; MORIS-VARA, F. Screening for novel enzymes. *Topics in Current Chemistry*, v. 200, p. 1-29, 1999.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their comercial application. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-74, 1997.
- DESAI, A.J.; JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 195–199, 2008.a
- DESAI, A.J.; JOSHI, S.; BHARUCHA, C. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4603–4608, 2008.b
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, v. 7, p. 173-180, 2004.
- DORN, E.; KNACKMUSS, H-J. Chemical Structure and Biodegradability of Halogenated Aromatic Compounds SUBSTITUENT EFFECTS ON 1,2-DIOXYGENATION OF CATECHOL. *Biochemical Journal*, v. 174, p. 85-94, 1978.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 61-69, 2001.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ERIKSSON, M.; OKKA, J.; MOHN, W.W. Effects of Low Temperature and Freeze-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, p. 5107–5112, 2001.
- ESPÓSITO, E.; AZEREDO, J. L. de. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004.
- EUSÉBIO, A.; TACÃO, M.; CHAVES, S.; TENREIRO, R.; ALMEIDA-VARA, E. Molecular assessment of microbiota structure and dynamics along mixed olive oil and winery wastewaters biotreatment. *Biodegradation*, v. 22, p. 773–795, 2011.
- EVANS, R.; ROGERS, M.A.; BAILEY, N.J.L. Evolution and alteration of petroleum in western Canada. *Chemical Geology*, v. 8, p. 147-170, 1971.
- FENNIRI, H. Rapid screening of biocatalysts. *Chemtech*, v. 26, p. 15-36, 1996.
- FERREIRA, A.P.R.; FERREIRA, O.M. Tratamento de efluentes de uma base de armazenamento de combustíveis, 2006. Disponível em:

http://fpambiente.planetaclix.pt/index_quem_somos.html. Acesso em 10 de Julho de 2011, 10:00.

FETTER, C.W. Contaminant hidrogeology. New York, Macmillan Publishing Company, 1993.

FLOODGATE D. The formation of oil emulsifying agents in hydrocarbonclastic bacteria. In: LoutitMW, Miles JAR, editors. *Microbiology Ecology*. New York: Springer-Verlag; p. 82–5, 1978.

FOX, S.L.; BALA, G.A.; Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANKENBERGER JR, W.T.; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.V.; W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, v. 160, p. 249—255, 2005.

FREIRE, R.S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, p. 504-511, 2000.

FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER. Degradation by microorganisms. *Biotechnology*, v. 11b, p. 145-167, 2000.

FROST, G.M.; MOSS D.A. Production of enzymes by fermentation. *Biotechnology*, v. 7, p. 65-211, 1987.

FUCHS, G. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *New York Academy of Sciences*, v. 1124, p. 82-99, 2008.

GALLEGO, J.L.R., MARTÍNEZ, M.J.G., LLAMAS, J.F., BELLOCH, C., PELÁEZ, A.I., SÁNCHEZ, J. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*, v. 18, p. 269-281, 2007.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *American Society for Microbiology*, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GAYLARD, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 01-10, 1999.

GIBSON, D.T. *Microbial Degradation of Organic Compounds*. New York: Marcel Dekker; 1984.

GIORDANO, G. Apostila tratamento e controle de efluentes industriais. Apostila da ABES. Mato Grosso, 2004.

GITI, E.; MEHDI, H. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, p. 170–178, 2008.

GOMEZ, E.; GARLAND, J.; CONTI, M. Reproducibility in the response of soil bacteria community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Applied Soil Ecology*, v. 26, p. 21–30, 2004.

GONZALEZ, G.; HERRERA, G.; GARCIA, M.T.; PENA, M. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresorce Technology*, v. 80, p. 137-142, 2001.

GONZALES, L.G.V.; TOREM, M.L. O efeito de dois diferentes anodos metálicos na eletrocoagulação de efluentes oleosos sintéticos. *Estudos Tecnológicos*, v. 6, p. 57-67, 2010.

GRAY, M.R.; DOROBANTU, L.S.; YEUNG, A.K.C.; FOGHT, J.M. Stabilization of Oil-Water Emulsions by Hydrophobic Bacteria. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, p. 6333–6336, 2004.

GRYTA, M.; KARAKUSLKI, K.; MORAWSKI, A.W. Purification of oily wastewater by hybrid UF/MD. *Water Research*, v. 35, p. 3665-3669, 2001.

GUCKERT, J.B.; CARRB, G.J.; JOHNSONB, T.D.; HAMM, B.G.; DAVIDSONA, D.H.; KUMAGAI, Y. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of Microbiological Methods*, v. 27, p. 183-197, 1996.

GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; RODRIGUES, L.R.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 68, p. 56-64, 2012.

GUIMARÃES, V. Resíduos de mineração e metalurgia: Efeitos poluidores em sedimentos e em espécie biomonitora Rio Ribeira de Igarapé – SP. Dissertação (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2007.

GUIMARÃES, M.S.O. Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamentos de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 763–781, 2004.

GUTIÉRREZ, M.C.; SLEEGERS, A.; SIMPSON, H.D.; ALPHAND, V.; FURSTOSS, R. The first fluorogenic assay for detecting a Baeyer-Villigerase activity in microbial cells. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 1, p. 3500-3506, 2003.

- HAMED, S.B.; REZGUI, R.; HALLEB, A.; GHRAM, A.; OUESLATI, R.; LABAT, M.; MAAROUFI, A. Efficiency of refinery sludge biodegradation using municipal wastewater and activated sludge and effect of hydrocarbon on culturable bacteria community. *Annual Microbiology*, v. 60, p. 747-755, 2010.
- HAMMANN, R.; KUTZNER, H. J. Key enzymes for degradation of benzoate, m and p-hidroxibenzoate by some members of order Actinonmicetales. *Journal of Basic Microbiology*, v. 38, p. 207-202, 1998.
- HARAYAMA. S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 1, p. 63-70, 1999.
- HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, p. 1-15, 2009.
- HARWOOD, C.S.; PARALES, R.E. THE B-KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. *Annual Review of Microbiology*, v. 50, p. 553-590, 1996.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235–251, 2006.
- HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; KERMANSHAHI, R.; CAPPELLO, S. Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination*, v. 19, p. 277–291, 2010.
- HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, p. 7–12, 2012.
- HASSEMER, M.E.N.; SENZ, M.L. Tratamento do efluente de uma indústria têxtil. Processo físico-químico com ozônio e coagulação/floculação. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 7, p. 30-36, 2002.
- HEATH, C.; HU, X.P.; CARY, C.; COWAN, D. Isolation and characterization of a novel, low-temperature-active alkaliphilic esterase from an Antarctic desert soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 4657-4659, 2009.
- HEINARU, E.; TRUU, J.; STOTTMEISTER, U.; HEINARU, A. A tree types of phenol and p-creosol catabolism in plenol-catabolism in phenol and p-creosol degrading bactéria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 31, p. 195-205, 2000.
- HU, X.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. "Study of ultrafiltration behaviour of emulsified metalworkings fluids", *Desalination*, v. 149, p. 191-197, 2002.
- HUANG, W.M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual Reviews of Genetics*, v. 30, p. 79-107, 1996.

HUNTER-CEVERA, J. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 278-285, 1998.

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

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 220–222, 2006.

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

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16, 396–403, 1998.

JING, W.; GUANG, J.; JING, T.; HONGDAN, Z.; HANPING, D.; LI, W. Functional characterization of a biosurfactant-producing thermo-tolerant bacteria isolated from an oil reservoir. *Petroleum Science*, v. 8, p. 353-356, 2011.

JOHNSON, D.B. Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 147–157, 2001.

JUHASZ, A.L.; STANLEY, G.A.; BRITZ, M.L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 396-401, 2000.^B

JUHASZ, A. L.; STANLEY, G.A.; BRITZ, M.L. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on Microtox and mutagenicity bioassays. *Bioremediation Journal*, v. 4, p. 271–283, 2000.^A

KABELITZ, N.; MACHACKOVA, J.; IMFELD, G.; BRENNEROVA, M.; PIEPER, D.H.; HEIPIEPER, H.J. JUNCA, H. Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 82, p. 565–577, 2009.

KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 2059-2067, 2000.

KNEZEVIC, Z.; MAVINIC, D.S.; ANDERSON, B.C. Pilot scale evaluation of anaerobic codigestion of primary and pretreated waste activated sludge. *Water Environmental Research*, v. 67, p. 835–841, 1995.

KAPLAN, N.; ROSENBERG, E. Surface-active properties of *Acinetobacter* exopolysaccharides. In: Inouye M, editor. Bacterial outer membranes as model systems. New York: John Wiley and Sons, Inc, p. 311–341, 1986.

KASTNER, M. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. *Biotechnology*, v. 11b, p. 211-239, 2000.

- KASUGA, I.; NAKAJIMA, F.; FURUMAI, H. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 61, p. 449-158, 2007.
- KESSELER, M.; DABBS, E.R.; AVERHOFFL, B.; GOTTSCHALK, B. Studies on the isopropylbenzene 2,3-dioxygenase and the 3-isopropylcatechol 2,3 dioxygenase genes encoded by the linear plasmid of *Rhodococcus erythropolis* BD2. *Microbiology*, 142, p. 3241-3251, 1996.
- KHANNA, S.; LAL, B. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied. Bacteriology*, v. 81, p. 355–362, 1996.
- KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2010-1016, 2006.
- KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a lipopeptide biosurfactante from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, p. 41-46, 1997.
- KIRK, O.; BORCHET, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnolog*, v. 13, p. 345-361, 2002.
- KIVISAAR, M.; HARAK, R.; KASAK, L.; HEINARU, A.; HABICHT, J. Selection of Independent Plasmids Determining Phenol Degradation in *Pseudomonas putida* and the Cloning and Expression of Genes Encoding Phenol Monooxygenase and Catechol 1,2-Dioxygenase. *Plasmid*, v. 24, p. 25-36, 1990.
- KOHNO, T.; SUGIMOTO, Y.; SEI, K.; MORI, K. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. *Environmental Microbiology*, v. 17, p. 114–212, 2002.
- KOKOSSIS, A.C.; ALVA-ARGÁEZ, A.; SMITH, R. The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition. *Chemical Engineering Journal*, v. 128, p. 33-46, 2007.
- KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, U. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. *Águas Subterrâneas*, v. 23, p. 31-44, 2009.
- KOMA, D.; SAKASHITA, Y.; KUBOTA, K.; FUJII, Y.; HASUMI, F.; CHUNG, S.Y.; KUBO, M. Degradation pathways of cyclicalcanes in *Rhodococcus* sp. NDKK48. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 92-99, 2005.
- KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology*, v. 35, p. 103–115, 1998.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Microbial deemulsifiers, p. 247-320 In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (Ed.) *Biosurfactants and Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1987.

KOSARIC, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Marcel Dekker Inc. p. 65-97, 1993.

KOSARIC, N. Biosurfactants ad their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, p. 295-304, 2001.

KOSTKA, J.E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W.A.; GREEN, S.J.; FREYER, G.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T.C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and environmental microbiology*, v. 1, p. 7962–7974, 2011.

KRIIPALU, M.; MARQUES, M.; NAMMARI, D.R.; HOGLAND, W. Bio-treatment of oily sludge: The contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 48, p. 616-622, 2007.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, p. 78-82, 2002.

KURTBOKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. Microbial genetic resources and Biodiscovery. WFCF Publications, UK, 2004.

KUSHMARO, A.; SIBONI, N.; SHAPIRO, O.H.; BEM-DOVI, E. Advantage of Using Inosine at the 3' Termini of 16S rRNA Gene Universal Primers for the Study of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6902-6906, 2006.

LA-DUC, M.T.; SATOMIB, M.; AGATAC, N.; VENKATESWARANA, K. gyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis–cereus–thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, p. 383–394, 2004.

LANE, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.

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

LEE, N-R.; HWANG, M-O.; JUNG, G-H.; KIM, Y-S.; MIN K-H. Physical Structure and Expression of *alkBA* Encoding Alkane Hydroxylase and Rubredoxin Reductase from *Pseudomonas maltophilia*. *Biochemical and biochemical and biophysical research communications*, v. 218, p. 17–21, 1996.

LEGGE, L.R.; ANDERSON, W.A.; GEHDER, M.; GROVE, J.A.; WEBER, K.P. Data transformation in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates *Journal of Microbiological Methods*, v. 69, p. 461-469, 2007.

LIBRALATO, G.; GHIRARDINI, A.V.; AVEZZÚ, F. Evaporation and air-stripping to assess and reduce ethanalamines toxicity in oily wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, p. 928–936, 2008.

LIMA, T. M. S. Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LIN, J.G.; CHANG, C.N.; CHANG, S.C. Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by alkaline solubilization. *Bioresource Technology*, v. 62, p. 85–90, 1997.

LIN, S.C.; MINTON, M.A.; SHARMA, M.M.; GEORGIUS, G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by a *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 31-38, 1994.

LIN, T.C.; PAN, P.T.; CHENG, S.S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal Hazardous. Materials*, v. 176, p. 27-34, 2010.

LINGENS, F.; VAN PEE, K.H.; CANDIDUS, S. The catechol 2,3 dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM : nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenases and evidence for an active-site histidine. *Microbiology*, v. 140, p. 321-330, 1994.

LISS, S.N.; VICTORIO, L.; GILBRIDE, K.A.; ALLEN, D.G. Phenotypic fingerprinting microbial communities in wastewater treatment systems. *Water Research*, v. 30, p. 1977-1086, 1986.

LIU, Z.; HUA, Z.; WU, Z.; ZHANG, H.; LU, D.; WANG, M.; LIU, Y. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere*, v. 80, p. 951–956, 2010.

LOH, K-C.; CHUA, S-S. *Ortho* pathway of benzoate degradation I *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, 320-326, 2002.

LOVLEY, D.L. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Publishing Group*, v. 1, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBOROUGH, N.J.; FARR, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, E.L.; HOEHNE, L.; FERREIRA, L.P.; SEVERO FILHO, W.A.; KIST, L.T. Tratamento de efluentes com óleos e graxas, fenois e surfactantes através de POA'S ferro-catalisados. *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 2005.

MADAMWAR, D.; PATEL, V.; CHETURVEDULA, S. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*, v. 201, p. 43– 51, 2012.

MADSEN, E.L.; STUART-KEIL, K.G.; HOHNSTOCK, A.M.; DREES, K.P.; HERRICK, J.B. Plasmids Responsible for Horizontal Transfer of Naphthalene Catabolism Genes between Bacteria at a Coal Tar-Contaminated Site Are Homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4. *Applied and environmental microbiology*, v. 64, p. 3633–3640, 1998.

MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B.K.C. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 77, p. 103–116, 2000.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources-a review. *Journal of Surface Determination*, v. 2, p. 237–241, 1999.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 5, p. 11-17, 2002.

MALIK, Z.A.; AHMED, S. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 650-658, 2012

MANAFI, M.; MEHRNIA, M.R.; SARRAFZADEH, M.H. Phenol removal from synthetic wastewater by *Alcaligenes faecalis*:online monitoring. *International Journal of Chemical and Environmental Engineerin*, v. 2, p. 103-107, 2011.

MANEERAT, S.; PHETRONG, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 29, p. 781-791, 2007.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 23-27, 2007.

MANTOVANI, S.M.; OLIVEIRA, L.G.; MARSAIOLI, A.J. Esterase Screening using Whole Cells of Brazilian Soil Microorganisms. *Brazilian Chemistry Society*, v. 21, p. 1484-1489, 2010.

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

MARGESIN, R.; SCHINNER F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 67, p. 3127–33, 2001.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 346-353, 2007.

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

MARQUÉS, A.M.; PINAZO, A.; FARFAN, M.; ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; ESPUNY, M.J. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 158, p. 110-117, 2009.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR, A. Application of lipases for wastewater treatment containing high levels of lipids. *Quimica Nova*, v. 28, p. 296–305, 2005.

MENG, Q.; ZHANG, H.Z.; LONG, X-W.; SHA, R-Y.; ZHANG, G.L.; Biotreatment of oily wastewater by rhamnolipids in aerated active sludge system. *Journal of Zhejiang University*, v. 10, p. 852-859, 2009.

MESQUITA, A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

MIHELICIC, J.R.; LUEKING, D.R.; MITZELL, R.J.; STAPLETON, J.M. Bioavailability of sorbed and separate-phase chemicals. *Biodegradation*, v. 4, p. 141-153, 1993.

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

MORELLI, I.S.; DEL PANNO, M.T.; DE ANTONI, G. L.; PAINCEIRA, M.T. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 55, p. 271–278, 2005.

MORITA, T.; MASSAKI, K.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Physiological differences in the formation of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, between *Pseudozyma Antarctica* and *Pseudozyma aphidis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 74, p. 307-315, 2007.

MOUNTEER, A.H.; BATISTA, S.B.; AMORIM, F.R.; TOTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 868-875, 2006.

MOWLA, D.; DARVISHIA, P.; AYATOLLAHIA, S.; NIAZID, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, p. 292–300, 2011.

- MROZIK, A.; PIETROWSKA-SEGET, Z.; LABUZEK, S. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 12, p. 15-25, 2002.
- MUELLER, J.G.; DEVEREUX, R.; SANTAVY, D.L.; LANTZ, S.E.; WILLIS, S.G.; Pritchard, P.H. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 71, p. 329–343, 1997.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, v. 94, p. 736-747, 2008.
- MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C.O.; JANNASCH, H.W. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, v. 164, p. 165–172, 1995.
- NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. Evaluation of mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 435-440, 2002.
- NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, R.; LEGMANN, R.; CARMELI, E.; RON, Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 290-297, 1995.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova. Campinas-SP*, v. 25, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 336-341, 2006.
- NKWELANG, G.; KAMGA, H.F.L.; NKENG, G.E. ANTAI, S.P. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1075-1080, 2008.
- OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 485-489, 1990.
- OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Elsevier Science*, v. 17, p. 13-20, 1999.
- OKERENTUGBA, P.O.; EZERONYE, O.U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 288-292, 2003.

OKPOKWASILI, G.C.; NWEKE, C.O. Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 293-295, 2003.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; JÚNIOR, A.F.C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, L.L.; DUARTE, I.C.S.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B. A. Influence of support material on the immobilization of biomas for the degradation of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 1261-1268, 2009.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINE, F.F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. *MultiCiência*, 2006.

OLIVERA, N.L.; COMMENDATORE, M.G.; DELGADO, O.; ESTEVES, J.L. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 542–548, 2003.

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

PADMAPRIYA, B.; RAJESWARI, T.; NOUSHIDA, E.; SETHUPALAN, D.G.; VENIL, C.K. Production of Lipase enzyme from *Lactobacillus* spp. And its application in the degradation of meat. *World Applied Sciences Journal*, v. 12, p. 1798-1802, 2011.

PADILHA, G.S.; FERREIRA, J.F.; CASTIGLIONI, G.L.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Avaliação da lípase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 31, p.15-22, 2011.

PAJE, M.L.F.; NEILAN, B.A.; COUPERWBITE, I. A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiology*, v. 143, p. 2975-2981, 1997.

PALEKAR, A.A.; VASUDEVAN, P.T.; YAN, S. Purification of lipase: a review. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, p. 177–200, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science.*, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANKRANTZ, T.M. Environmental Engineering Dictionary and Directory. CRC Press, Boca Raton, FL. 2001.

PATIL, J.R.; CHOPADE, B.A. Studies on bioemulsier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 290-298, 2001.

PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, p. 91-94, 1997.

PATEL, R.N.; HOU, C.T.; FELIX, A.; LILLARD, M.O. Catechol 1,2-Dioxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: Purification and Properties. *American Society for Microbiology*, v. 1976.

PENDASHEH, A.R.; RAZI, A.F.; CHAIBAKHSH, N.; ABDULLAH, L.C.; MADAENI, S.S.; ABIDIN, Z.Z. Modeling of membrane bioreactor treating hypersaline oily wastewater by artificial neural network. *Journal of Hazardous Materials*, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.05.052, 2010.

PENNER, G.C. Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detetor de Fotoionização. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2000.

PEREIRA, W.S.; FREIRE, R.S. Ferro zero: Uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. *Química Nova*, v. 28, p. 130-136, 2005.

PHAM, T.H.; JEREMY, S.; WEBB, J.S.; REHM, B.H.A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*, v. 150, p. 3405-3413, 2004.

PLAZA, G.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I.M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 50, p. 71-77, 2006.

PLAZA, G.A.; JANGID, E.K.; LUKASIK, E.K.; NALECZ-JAWECKI, E.G.; BERRY, E.C.J.; BRIGMON, E.R.L. Reduction of Petroleum Hydrocarbons and Toxicity in Refinery Wastewater by Bioremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 81, p. 329-333, 2008.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-156, 1989.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*, v. 42, p. 172-179, 2008.

PROSSER, J.I.; MCCAIG, A.E.; GLOVER, A. Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1721-1730, 1999.

PROVIDENTI, M.A.; FLEMING, C.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of addition of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries, *FEMS Microbiology Ecology*, v. 17, p. 15-26, 2005.

PUEYO, M.T.; BLOCH JR, C.; CARMONA-RIBEIRO, A.C.; DI MASCIO, P. Lipopeptides Produced by a Soil Bacillus Megaterium Strain. *Microbial Ecology*, v. 57, p. 367–378, 2009.

PUNTUS, I.F.; SAKHAROVSKY, V.G.; FILONOV, A.E.; BORONIN, A.M.; SKRYABIN, G.K. Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2643-2648, 2005.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C. *Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. *Química Nova*, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

QING, J.L.; QING, O.Z.; OUYANG, Z.Y. Ecological behavior of linear alkyl benzenesulfonate (LAS) in soil plant systems. *Pedosphere*, v. 15, p. 216-224, 2005.

RAHMAN, K.S.M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, v. 85, p. 257–261, 2002.

RAKATOZAFY, H.; BOUCHEZ-NAITALI, M.; MARCHAL, R.; LEVEAU J-Y.; VANDECASTEELE, J-P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 421–428, 1999.

RAMOS, J.L.; DUQUE, E.; HUERTAS M.-J.; HAIDOUR, A. Isolation an expansion of the catabolic potential of a Pseudomonas putida train able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 3911-3916, 1995.

RAUCH, M.E.; GRAEF, H.W.; ROZENZHAK, S.M.; JONES, S.E.; BLECKMANN, C.A.; KRUGER, R.L.; NAIK, R.R.; STONE, M.O. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 29–36, 2006.

REYMOND, J.L.; WAHLER, D. NOVEL. High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 535-544, 2001

RISER-ROBERTS, E. *Bioremediation of petroleum contaminated sites*. Boca Ratón, FL. CRC Press, 1992.

RISER-ROBERTS, E. *Remediation of Petroleum Contaminated Soils*. Lewis Publishers, 1998.

RODRIGUES, D.F. *Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de hidrocarbonetos*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, 2002.

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

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 249–252, 2002.

ROS, M.; RODRIGUEZ, I.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6916–6923, 2010.

ROSA, J.J.; RUBIO, J. Desenvolvimento de um novo processo de tratamento de águas oleosas - Processo FF. XIX Prêmio Jovem Cientista – Água – Fonte da Vida, 2003.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, p. 307-334, 1997.

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

SAEKI, H.; AKIRA, M.; FURUHASHI, K.; AVERHOFFL, B.; GOTTSCHALKL, G. Degradation of trichloroethene by a linearplasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology*, v. 145, p. 1721-1730, 1999.

SAIKIA, R.R.; DEKA, S.; DEKA, M.; BANAT, I.M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 753–763, 2012.

SAIMMAI, A.; RUKADEE, O.; ONLAMOOL. T.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Characterization and Phylogenetic Analysis of Microbial Surface Active Compound-Producing Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, p. 1003–1018, 2012.b

SAIMMAI, A.; TANI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant-producing bacteria. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 1669–1679, 2012. a

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

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 12, p. 370–375, 1990.

SANOMYA, L. T.; NAHAS. E, Microrganismo produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e no nitrogênio do solo. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 33, p. 835-842, 2003.

SANTO DOMINGO, J.W.; FUENTES, F.A.; HAZEN, T.C. Survival and Activity of *Streptococcus faecalis* and *Escherichia coli* in Petroleum-contaminated Tropical Marine Waters. *Environmental Pollution*, v. 56, p. 263-281, 1989.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v. 136, p. 187-195, 2005.

SATYANARAYANA, T.; RAGHUKUMAR, C.; SHIVAJI, S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, v. 89, p. 78-90, 2005.

SAYLER, G.S.; SANSEVERINO, J.; APPLGATE, B.M.; HENRY KING, J.M. Plasmid-Mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene, and Anthracene. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1931-1937, 1993.

SCHALLER, K.D.; FOX, S.L.; BRUHN, D.F.; NOAH, K.S.; BALA, G.A. Characterization of Surfactin from *Bacillus subtilis* for Application as an Agent for Enhanced Oil Recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 113-116, 2004.

SCHNEIDER, C., MO, K., LISS, S. Applying Phenotypic Fingerprinting in the Management of Wastewater Treatment Systems. *Water Science and Technology*, v. 37, p. 461-464, 1998.

SCHULZ, C.K. Tratamento de efluentes oleosos utilizando processos de separação por membranas. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

SEI K, ASANO K, TATEISHI N, MORI K, IKE M & FUJITA M. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, p. 542-550, 1999.

SEI, K.; SUGIMOTO, Y.; MORI, K.; MAKI, H.; KOHNO, T. Monitoring of alkane degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. *Environmental Microbiology*, v. 5, p. 517-522, 2003.

SEO, J.S.; KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Environmental Research and Public Health*, v. 6, p. 278-309, 2009.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. *Indian Journal of Microbiology*, v.35, p.165-184, 1995.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H.; NUHI, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus sp.* strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 82, p. 477-482, 2011.

- SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 110–116, 1987.
- SHETE, A.M. Studies on isolation, biochemical and physiological characteristics, antibiotic and bioemulsifier production and plasmid genetics of marine *Acinetobacter*. Ph.D. Thesis University of Pune, Maharashtra, India, 2003.
- SILVA, J.A.F. Sistematização e avaliação de técnicas de investigação aplicadas à caracterização e diagnóstico de área contaminada por hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, 2002.
- SILVA, F. L. N.; SANTOS, J. R.; NETO, J. M. M.; SILVA, R. L. G. N. P.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E. Determinação de benzeno, tolueno etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Química Nova*, v. 32, p. 56-60, 2009.
- SINGH, A.; WARD, O.P. Biodegradation and Bioremediation: Series: Soil Biology, vol. 2, Springer-Verlag, New York, 2004
- SINGH, A.; VAN-HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 99–121, 2007.
- SINGH, C.; LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1927–1932, 2008.
- SINGH, S.; SINGH, B.B.; CHANDRA, R.; PATEL, D.K.; RAI, V. Synergistic biodegradation of pentachlorophenol by *Bacillus cereus* (DQ002384), *Serratia marcescens* (AY927692) and *Serratia marcescens* (DQ002385). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 1821–1828, 2009.
- SRIJAROONRAT, P.; JULIEN, E.; AURELLE, Y.; “Unstable secondary oil/water emulsion treatment using ultrafiltration: fouling control by backflushing”, *Journal of Membrane Science*, v. 159, p.11-20, 1999.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International journal of systematic bacteriology*, v. 44, p. 846-849, 1994.
- STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDUROFF, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Journal of Genetic and Microbiology* v. 43, p. 159-271, 1966.
- STALEY, J. Microbial Diversity and the Biosphere. www.bdt.org.br/oea/sib/staley, 1998.
- STRUJAK, D.; VIDAL, C.M.S. Poluição das águas – Revisão de literatura. *Revista Eletrônica Lato Sensu*, ano 2, nº 1, 2007.

SUTHAR, H.; HINGURAO, K.; DESAI, A.; NERURKAR, A. Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. *Journal of Microbiological Methods*, v. 75, p. 225-230, 2008.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian Journal Environmental Health Science Engineering*, v. 2, p. 6-12, 2005.

TELLEZ, G.T.; NIRMALAKHANDAN, N.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Performance evaluation of an activated sludge system for removing petroleum hydrocarbons from oilfield produced water. *Advances in Environmental Research*, v. 6, p. 255-470, 2002.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 917–925, 2008.

THOMAS, C.M.; GREATER, A.; LAMBERTSEN, L.; WILLIAMS, P.A. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, v. 4, p. 856–871, 2002.

THOMAS, J. E. Fundamentos da engenharia do petróleo, Rio de Janeiro; Editora Interciência, Rio de Janeiro-RJ, 2001

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, v. 27, p. 441-446, 2004.

TOLEDO, F.L.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; CALVO, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter species* in liquid culture. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8470–8475, 2008.

TREVORS, J.T.; DEVENDER, K.J.; LEE, H. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 10, p. 87-93, 1992.

TRI, P.T. Oily Wastewater treatment by membrane Biorreactor Process coupled with biological Activated carbon process. Dissertação (Mestrado). Asian Institute of Technology, 2002.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 616–622, 2009.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants treatment of crude contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 276, p. 456-464, 2004.

URURAHÍ, A.F.P.; PEREIRA, N.; MARINS, M. D. M. Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa. *Boletim Técnico PETROBRÁS*, Rio de Janeiro, v. 41, p. 125-132, 1998.

UYSAL, A.; TURKMAN, A. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2745–2749, 2005.

VAN BEILEN, J.; LI, Z.; DUETZ, W.A.; SMITS, T.H.M.; WITHOLT, B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*, v. 58, p. 427–440, 2003.

VAN BEILEN, J.B.; FUNHOFF, E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 13-21, 2007.

VAN DER MEER, J.R.; EGGEN, R.I.L.; ZEHNDER, A.J.B.; VOS, W.M. Sequence Analysis of the *Pseudomonas* sp. Strain P51 tcb Gene Cluster, Which Encodes Metabolism of Chlorinated Catechols: Evidence for Specialization of Catechol 1,2-Dioxygenases for Chlorinated Substrates. *Journal of Bacteriology*, p. 2425-2434, 1991.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, p. 503-549, 2003.

VANCE-HARROP, M. H. Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção de biossorção do pireno (derivado do petróleo). Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

VARGA, M.V.; NEUJAHN, H.Y. Purification and properties of catechol 1-2 dioxygenase from *Trichosporum cutaneum*. *European Journal of Biochemistry*, v. 12, p. 427-434, 1970.

VASCONCELLOS, S.P. Atividades enzimáticas e de biodegradação de microrganismos do petróleo da Bacia de Campos (Pampo sul). Dissertação (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, 2006.

VASCONCELLOS, S.P.; CRESPIM, E.; CRUZ, J.F.; SENATORE, D.B.; SIMIONI, K.C.M.; SANTOS, E.V.; MARSAIOLI, A.J.; OLIVEIRA, V.M. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, v. 40, p. 574-588, 2009.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D.; STOIMENOVA, E.; LALCHEV, Z. Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. *Microbiological Research*, v. 163, p. 481—486, 2008.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 6210-6219, 2002.

VONBERG, A.; KLINNER, U. Distribution of alkB genes within n-alkane-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 339–348, 2000.

VON SPERLING, M. Princípios básicos do tratamento de esgotos. vol 2. Departamento de engenharia sanitária e ambiental. Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

XU, D.; CÔTÉ, J-C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 39 end 16S rDNA and 59 end 16S–23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 695–704, 2003.

WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. Green Chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, New York, v. 24, p. 775-799, 2004.

WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, v. 1, p. 79-92, 1990.

WEI, Y.H.; WANG, L.F.; CHANG, J.S.; KUNG, S.S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p. 174-178, 2003.

WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVO, A.D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, p. 1010-1020, 2010.

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

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. *Biodegradation*, v. 7, p. 415–423, 1997.

WILSON, B.H.; SMITH, G.B.; REES, J.F. Biotransformations of Selected Alkylbenzenes and Halogenated Aliphatic Hydrocarbons in Methanogenic Aquifer Material: A Microcosm Study. *Environmental Science and Technology*, v. 20, p. 997-1002, 1986.

WOJCIESZYNSKA, D.; GUZIK, U.; GREN, I.; PERKOSZ, M.; HUPERT-KOCUREK, K. Induction of aromatic ring cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 805-811, 2011.

WREN, B.; VENOSA, A.D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most probable number. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 252-258, 1996.

YAMADA-ONODERA, K.; MUKUMOTO, H.; KASTSUYAMA, Y.; TANI, Y. Degradation of long-chain alkanes by polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 828-831, 2000.

YOSHIDA, N.; YAGI, K.; SATO, D.; WATANABE, N.; KUROISHI, T.; NISHIMOTO, K.; YANAGIDA, A.; KATSURAGI, T.; KANAGAWA, T.; KURANE, R.; TANI, Y. Bacterial

Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 99, p. 143–149, 2005.

YOUSAF, S.; AFZAL, M.; REICHENAUER, T.G.; BRADY, C.L.; SESSITSCH, A. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environmental Pollution*, v. 159, p. 2675-2683, 2011.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.R.; DUNCAN, K.E. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental in Microbiology*, v. 73, p. 1239–1247, 2007.

YUSTE, L.; CORBELLA, M.E.; TURIEGANO, M.J.; KARLSON, U.; PUYET, A.; ROJO, F. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 32, p. 69–75, 2000.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. *CRC Critical Reviews Biotechnology*, v. 1, p. 87-107, 1984.

ZHANG, C.; LI, Q.; KANG, C. Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 873–877, 2005.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil: A brief review. *Journal of soils and sediments*, v. 8, p. 379-388, 2008.

ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4111- 4116, 2011.

ZHUANG, W.Q.; TAY, J.H.; MASZENAN, A.M.; TAY, S.T. *Bacillus naphthovorans* sp. nov. from oil-contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 547–553, 2002.

ZOSIM, Z.; GUTNICK, D. L.; ROSEMBERG, E. Properties of hydrocarbon-in water emulsions stabilised by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, p. 281–292, 1982.

ANEXO

Anexo 1: Fontes de carbono presentes no sistema Biolog-ECOPLATE

CARBOIDRATOS

D-Celbiose
D-Xilose
I-Eritritol
D-Manitol
N-acetil-D- glicosamina
 α -D-lactose
 β -Metil-D-glicosídeo
Glicose-1-fosfato
D, L- α -glicerol fosfato
Ácido D-galactônico- γ -lactônico

POLÍMEROS

Tween40
Tween80
 α -Ciclodextrina
Glicogênio

COMPOSTOS FENÓLICOS

2-Hidroxy ácido benzóico
4 -Hidroxy ácido benzóico

AMINAS/AMIDAS

Feniletilamina
Putrescina

AMINOÁCIDOS

L-Arginina
L-Asparagina
L-Fenilalanina
L-Serina
L-Treonina
Ácido Glicil- L- Glutâmico

ÁCIDOS ACÉTICOS-CARBOXÍLICOS

D-Ácido Galacturônico
Ácido γ -Hidroxibutírico
Ácido Itacônico
Ácido α -cetobutírico
D-Ácido Málico
D-Ácido Glicosamínico
Ácido Pirúvico metil éster

ANEXO 2: Descrição das colônias, morfologia celular, reação tintorial de gram e densidade dos isolados obtidos do efluente oleoso por meio do plaqueamento direto, plaqueamento de alíquotas das microplacas e pelo método de enriquecimento

| Método do isolamento | Meio de isolamento | Morfotipo | Descrição das colônias | Morfologia celular e reação tintorial de gram | Densidade (UFC mL ⁻¹) |
|---|--------------------|-----------|---|---|-----------------------------------|
| Plaqueamento direto | AO | LAPT 1 | amarela, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete curto G- | 3x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 3 | rosa, opaca, lisa, borda regular | Cocos G+ | 2x10 ² |
| | AO | LAPT 4 | amarela, cremosa, lisa, borda irregular | Bastonete G- | 3x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 5 | amarela, cremosa, puntiforme, borda regular | Cocos G+ | 2x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 6 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 2,3x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 7 | branca, opaca, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 1x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 8 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 3x10 ² |
| | AO | LAPT 9 | branca (quase transparente), opaca, rugosa, borda irregular | Estreptobastonete G+ | 2x10 ³ |
| | AO | LAPT 12 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 6x10 ² |
| | AO | LAPT 14 | amarela-clara cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 2x10 ² |
| | AO | LAPT 15 | amarela, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1,6x10 ⁴ |
| | AO | LAPT 17 | amarela, cremosa, rugosa, borda irregular | Coco G+ | 1x10 ³ |
| | AO | LAPT 20 | transparente, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 2x10 ³ |
| | AO | LAPT 21 | branca, pouco cremosa, rugosa, com borda irregular | Bastonete G+ | 5x10 ³ |
| | AO | LAPT 22 | branca, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 2x10 ⁴ |
| Total | 15 | | | | 1,6x10 ⁵ |
| Plaqueamento de alíquotas das microplacas | MQ | LAPM 23 | branca, opaca, rugosa, cremosa no centro, borda muito irregular | Bastonete G+ | 2,5x10 ⁵ |
| | MQ | LAPM 24 | amarela, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 4x10 ⁵ |
| | MQ | LAPM 26 | branca (quase transparente), cremosa, lisa, borda regular | Coco G+ | 1x10 ⁶ |
| | MOL | LAPM 27 | amarela, lisa, cremosa, borda regular | Bastonete G- | 1,2x10 ⁷ |
| | MOL | LAPM 28 | marrom, lisa, cremosa, borda regular | Bastonete G- | 5x10 ⁶ |
| | MOL | LAPM 29 | amarela, cremosa, rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 7x10 ⁵ |
| | MOL | LAPM | amarela, opaca, lisa, borda | Cocobacilo G- | 2,1x10 ⁷ |

| | | | | | |
|--|---|----------------------|--|--------------------------|---------------------|
| | | 30 | regular | | |
| | MOL | LAPM 31 | amarela, cremosa, lisa, borda irregular | Bastonete G- | 1,7x10 ⁷ |
| | MOL | LAPM 32 | amarela, branca no centro, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete curto G- | 1,4x10 ⁷ |
| | MOL | LAPM 33 | amarela escura, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 6x10 ⁵ |
| | MOL | LAPM 34 | laranja, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 3,1x10 ⁶ |
| | MP | LAPM 36 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 3,2x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 37 | branca, cremosa, lisa, borda regular, anel periférico | Bastonete curto G- | 2,1x10 ⁶ |
| | MP | LAPM 38 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Diplococos G- | 4,3x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 39 | branca, opaca, rugosa, com borda regular | Estreptobaston ete G+ | 1,4x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 40 | branca, lisa, cremosa, borda regular | Bastonete G- | 5,7x10 ⁵ |
| | MP | LAPM 41 | transparente, puntiforme, pouco opaca, pouco rugosa, borda regular | Cocobacilo G- | 5,2x10 ⁵ |
| | MOL | LAPM 42 | bege, cremosa, lisa, borda regular filamentosa | Bastonete G- | 3,6x10 ⁷ |
| | MOL | LAPM 43 | amarela, cremosa, rugosa, alta borda irregular clara | Bastonete G- | 1,4x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 44 | branca, cremosa, lisa borda regular | Bastonete G+ | 2,7x10 ⁵ |
| | MP | LAPM 45 | amarela, cremosa, lisa, com borda regular | Coco G+ | 2,7x10 ⁵ |
| | MP | LAPM 46 | bege, cremosa, lisa, borda regular | Diplococos G+ | 1,2x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 47 | marrom-clara, pouco opaca, rugosa, com borda regular | Bastonete curto G+ | 4,1x10 ⁷ |
| | MP | LAPM 48 | amarela, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 5x10 ⁶ |
| | MP | LAPM 49 | marrom, rugosa, opaca, borda regular | Bastonete G+ | 8x10 ⁶ |
| | MP | LAPM 50 | transparente, puntiforme, rugosa, pouco cremosa, borda regular | Bastonete G- | 2,9x10 ⁷ |
| | MQ | LAPM 51 | amarela clara, rugosa, pouco cremosa borda regular, | Bastonete G+ | 2,3x10 ⁷ |
| | MQ | LAPM 52 | amarela, puntiforme, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 3,9x10 ⁷ |
| | MQ | LAPM 53 | amarela clara, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 5,2x10 ⁷ |
| | Total | 29 | | | 4,3x10 ⁸ |
| | | LAPER MMBPB 54 | transparente, puntiforme, cremosa, lisa, protuberância | Cocobacilo G- | 6x10 ⁴ |
| | Plaqueamento do enriquecimento | 129 | | | |

| central, borda regular | | | | |
|------------------------|----------|--|--------------------|---------------------|
| MMBPB | LAPER 55 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Diplococos G+ | 7,6x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPER 56 | amarelo escuro, cremosa, pouco rugosa, borda regular | Bastonete curto G- | 3x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 57 | amarelo-laranja, cremosa, lisa, com borda regular | Bastonete G- | 8x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 58 | amarela, cremosa, rugosa, borda regular | Cocobacilo G+ | 4x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 59 | amarela clara, cremosa, lisa, rdaregular com anéis periféricos | Bastonete G+ | 1x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 60 | marrom clara, opaca, rugosa, borda regular transparente | Cocobacilo G- | 1x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 61 | branca, pouco cremosa, rugosa, borda regular | Cocobacilo G- | 3x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPER 62 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 3x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPER 63 | amarela, cremosa, lisa, borda irregular | Coco G+ | 2x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPER 64 | transparente, plana, cremosa, rugosa, borda irregular | Diplococos G+ | 3x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPER 66 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 5x10 ⁵ |
| BHIOR | LAPER 67 | bege, opaca, lisa, borda regular filamentosa | Estreptobastone G+ | 1x10 ⁸ |
| BHIOR | LAPER 68 | branca, opaca, centro cremoso, rugosa, borda regular | Estreptobastone G+ | 2,1x10 ⁷ |
| BHIOR | LAPER 69 | salmão, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 3x10 ⁸ |
| MMBOR | LAPER 70 | amarelo escura, opaca, lisa, borda regular filamentosa | Bastonete G+ | 1x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 71 | bege, opaca, rugosa, borda regular filamentosa | Bastonete G+ | 2x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 72 | bege, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 2x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 73 | bege, opaca, rugosa, borda irregular | Estreptobastone G+ | 4x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 74 | amarelo escura, pouco cremosa, rugosa, borda regular filamentosa | Bastonete G+ | 5x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 76 | marrom clara, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 3x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 77 | branca, cremosa, lisa, borda irregular | Bastonete G+ | 3,2x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER 78 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 1x10 ⁷ |
| MMBOR | LAPER | branca, opaca, rugosa, borda | Bastonete G+ | 1,5x10 ⁸ |

| | | | | | |
|-------|--|--------------|--|--------------------------|----------------------|
| | | 79 | regular | | |
| MMBOR | | LAPER 80 | branca, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 7x10 ⁷ |
| MMBOR | | LAPER 81 | marrom clara, média, cremosa, lisa, rugosidade central, borda regular | Estreptobaston ete G+ | 3x10 ⁷ |
| BHIPB | | LAPER 82 | marrom, pouco cremosa, rugosa, borda regular | Diplobastonete G+ | 1x10 ⁹ |
| BHIPB | | LAPER 83 | branca, opaca, muito rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 2,1x10 ⁹ |
| BHIPB | | LAPER 84 | amarela, opaca, rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 1,4x10 ⁹ |
| BHIPB | | LAPER 85 | branca, opaca, muito rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 3,1x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPER 86 | marrom, opaca, rugosa, borda regular filamentosa | Bastonete G+ | 1,8x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPER 87 | branca, opaca, rugosa, borda irregular | Estreptobaston ete G+ | 2,2x10 ⁸ |
| MMBPB | | LAPER 88 | transparente, cremosa, lisa, borda irregular | Coco G+ | 2x10 ⁴ |
| MMBOR | | LAPER 89 | bege, opaca, pouco rugosa, borda regular | Cocobacilo G- | 2,7x10 ⁶ |
| BHIOR | | LAPER 90 | branca, opaca, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 6x10 ⁶ |
| BHIOR | | LAPER 91 | branca, pouco cremosa, rugosa, borda irregular | Estreptobaston ete G+ | 4x10 ⁵ |
| BHIOR | | LAPER 92 | bege, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 3x10 ⁶ |
| MMBOR | | LAPER 93 | branca, opaca, lisa, borda irregular | Bastonete G+ | 9x10 ⁵ |
| MMBOR | | LAPER 94 | marrom clara, opaca, rugosa, borda irregular | Cocobacilo G- | 6x10 ⁵ |
| BHIPB | | LAPER 95 | branca, opaca, centro cremoso, rugosa, borda irregular | Estreptobaston ete G+ | 3x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPEO 96 | branca, opaca, lisa, borda irregular | Bastonete G- | 2x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPEO 97 | bege, pouco cremosa, lisa, periferia rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 1,2x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPER 98 | branca, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete G+ | 1,28x10 ⁹ |
| BHIPB | | LAPEO 99 | branca, pouco cremosa, lisa, borda irregular | Estreptobaston ete G+ | 5x10 ⁸ |
| BHIPB | | LAPEO 100 | marrom, opaca, rugosa, borda irregular | Bastonete longo G+ | 2x10 ⁷ |
| BHIPB | | LAPEO 101 | branca, opaca, rugosa, borda irregular | Estreptobaston ete G+ | 1,1x10 ⁷ |
| BHIPB | | LAPEO 102 | bege clara, cremosa, rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 2,3x10 ⁷ |

| | | | | |
|-------|-----------|---|--------------------|---------------------|
| BHIPB | LAPEO 103 | amarela, pouco cremosa, rugosa, borda regular filamentosa | Estreptobastone G- | 2,6x10 ⁷ |
| BHIPB | LAPEO 104 | transparente, puntiforme, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 4x10 ⁶ |
| BHIPB | LAPEO 105 | amarela, opaca, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 1,1x10 ⁶ |
| BHIPB | LAPEO 106 | branca, opaca, rugosa, borda regular filamentosa | Bastonete G+ | 2,2x10 ⁷ |
| BHIPB | LAPEO 107 | bege, pouco cremosa, rugosa, borda irregular | Estreptobastone G+ | 6,7x10 ⁸ |
| BHIPB | LAPEO 108 | bege escuro, cremosa, pouco rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 1,7x10 ⁷ |
| MMBPB | LAPEO 109 | branca, pouco cremosa, lisa, borda irregular | Bastonete G- | 3x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 110 | transparente, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G+ | 3,2x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 111 | amarelo claro, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1,6x10 ⁶ |
| MMBPB | LAPEO 112 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1,3x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPEO 113 | amarelo clara, pouco opaca, lisa, borda irregular | Bastonete G- | 1,2x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 114 | colônia amarela, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 115 | amarelo claro, pouco cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1,9x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 116 | amarelo claro, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete curto G+ | 2x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPEO 117 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Bastonete G- | 1,2x10 ⁴ |
| MMBPB | LAPEO 118 | branca, cremosa, lisa, borda regular | Cocos G+ | 2,8x10 ⁵ |
| MMBPB | LAPEO 119 | transparente, cremosa, lisa, borda regular filamentosa | Cocobacilo G- | 3x10 ³ |
| MMBPB | LAPEO 121 | branca, cremosa, pouco rugosa, borda regular | Bastonete G+ | 1x10 ³ |
| MMBPB | LAPEO | amarelo escuro, cremosa, | Cocos G+ | 5,1x10 ⁶ |

Legenda: AO (amostra original); MOL (meio mineral suplementado com óleo lubrificante); MP (meio mineral suplementado com parafina); MQ (meio mineral suplementado com querosene); MMBPB (meio mineral suplementado com petróleo bruto); MMBOR (meio mineral para bactérias suplementado com óleo recuperado); MMBPB (meio mineral para bactérias suplementado com petróleo bruto); BHIPB (meio BHI adicionado de petróleo bruto); BHIOR (meio BHI adicionado de óleo recuperado); LAPT (Lagoa aerada plaqueamento total); LAPM (Lagoa aerada plaqueamento das micropilhas); LAPER (Lagoa aerada plaqueamento enriquecimento em meio rico); LAPEO (Lagoa aerada plaqueamento enriquecimento em meio com óleo); G+ (Gram positivo); G- (Gram negativo).

Anexo 3: Crescimento (D.O 600nm e biomassa seca), índice de emulsificação, e atividade surfactante (espalhamento da gota e leitura da tensão superficial), dos isolados após o cultivo em meio MMB adicionado de óleo bruto ou glicose.

| Método do isolamento | Isolado | D.O (600nm) | | Biomassa seca (mg/ml) | | E 24 (%) | | Espalhamento da gota (D) | | Tensão superficial (mN/m) | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | G | OB | G | OB | G | OB | G | OB | G | OB |
| Plaqueamento direto | LAPT 1 | 0,35 ± (0,04) ZAa | 0,31 ± (0,00) ZAa | 1,25 ± (0,21) Sa | 0,90 ± (0,28) Sa | 14,90 ± (0,2) MNa | 0,00 ± (0,00) MNa | 0,28 ± (0,09) Fb | 1,35 ± (0,16) Fa | - | - |
| | LAPT 3 | 0,38 ± (0,13) BCa | 0,11 ± (0,11) BCa | 1,30 ± (0,14) Ra | 0,95 ± (0,21) Ra | 9,40 ± (0,92) BCa | 22,70 ± (0,00) BCa | 0,37 ± (0,11) Fb | 1,08 ± (0,35) Fa | 50,91 ± (2,71) LMa | 51,36 ± (0,63) LMa |
| | LAPT 4 | 0,34 ± (0,03) BCa | 0,15 ± (0,11) BCa | 1,15 ± (0,07) Ra | 1,05 ± (0,21) Ra | 19,10 ± (0,64) PQa | 26,20 ± (1,1) PQa | 1,35 ± (0,50) Fa | 0,30 ± (0,07) Fb | 49,66 ± (1,93) IJa | 50,67 ± (0,82) IJa |
| | LAPT 5 | 0,70 ± (0,01) LMa | 0,31 ± (0,00) LMa | 2,20 ± (0,16) Da | 1,20 ± (0,00) Db | 72,70 ± (0,00) La | 37,25 ± (1,20) Lb | 0,39 ± (0,00) Fa | 1,07 ± (0,62) Fa | 48,24 ± (4,29) Ua | 46,14 ± (3,13) Ua |
| | LAPT 6 | 0,51 ± (0,02) ZAa | 0,11 ± (0,11) ZAa | 1,15 ± (0,35) NOa | 0,25 ± (0,07) Nob | 16,65 ± (3,32) JLa | 0,00 ± (0,00) JLa | 1,46 ± (0,41) Aa | 1,44 ± (0,14) Aa | 41,52 ± (1,59) Ja | 44,94 ± (5,04) Ja |
| | LAPT 7 | 0,52 ± (0,14) VXa | 0,19 ± (0,00) VXa | 1,20 ± (0,28) Ra | 1,05 ± (0,07) Ra | 17,50 ± 0,6) VXa | 20,00 ± (0,70) VXa | 0,39 ± (0,25) Fa | 0,39 ± (0,39) Fa | 48,61 ± (10,2) Qa | 42,79 ± (1,86) Qa |
| | LAPT 8 | 1,21 ± (0,05) CDa | 0,46 ± (0,15) CDb | 1,20 ± (0,00) Ra | 1,00 ± (0,00) Ra | 12,50 ± (0,53) HIa | 5,00 ± (0,7) HIa | 1,00 ± (0,57) Fa | 0,40 ± (0,15) Fa | 54,48 ± (3,54) PQa | 51,18 ± (4,03) PQa |
| | LAPT 9 | 0,30 ± (0,00) DEa | 0,15 ± (0,11) DEa | 1,25 ± (0,07) Ra | 0,97 ± (0,17) Ra | 37,25 ± (1,20) CDa | 26,20 ± (0,7) CDa | 0,29 ± (0,00) Fa | 0,50 ± (0,30) Fa | 47,52 ± (0,16) Za | 48,50 ± (4,13) Za |
| | LAPT 12 | 1,05 ± (0,01) Xa | 0,83 ± (0,00) Xa | 1,05 ± (0,21) Za | 0,85 ± (0,21) Za | 12,50 ± (3,54) Xb | 65,66 ± (3,56) Xa | 0,25 ± (0,12) Ga | 0,41 ± (0,19) Ga | 42,5 ± (2,84) Já | 43,91 ± (0,08) Já |
| | LAPT 14 | 0,72 ± (0,03) LMa | 0,45 ± (0,06) LMa | 1,05 ± (0,07) Va | 0,95 ± (0,07) Va | 10,00 ± (0,1) JLa | 5,55 ± (0,85) JLa | 0,56 ± (0,38) Ga | 0,08 ± (0,04) Ga | 40,98 ± (4,84) Oa | 49,50 ± (3,55) Oa |
| | LAPT 15 | 0,39 ± (0,05) ZAa | 0,26 ± (0,03) ZAa | 1,15 ± (0,21) Qa | 1,15 ± (0,07) Qa | 53,80 ± (1,69) Ao | 43,55 ± (2,05) Oa | 0,45 ± (0,05) Fa | 0,86 ± (0,07) Fa | 47,17 ± (1,44) ABa | 50,55 ± (2,35) ABa |
| | LAPT 17 | 0,45 ± (0,00) VXa | 0,27 ± (0,00) VXa | 1,25 ± (0,07) Qa | 1,10 ± (0,00) Qa | 37,50 ± (0,6) Tua | 2,50 ± (0,53) TUB | 0,62 ± (0,23) Fa | 0,67 ± (0,30) Fa | 45,51 ± (5,89) Ra | 46,52 ± (4,92) Ra |
| LAPT 20 | 0,46 ± (0,03) RSa | 0,33 ± (0,03) RSa | 0,90 ± (0,00) NOa | 0,50 ± (0,00) NOa | 57,50 ± (3,54) Ao | 40,00 ± (7,07) Oa | 0,84 ± (0,01) Fa | 0,94 ± (0,86) Fa | 35,35 ± (1,17) Da | 46,07 ± (1,03) Db | |

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | | | | | | | | |
| | LAPT 21 | 0,78 ± (0,13) NOa | 0,21 ± (0,01) NOb | 0,85 ± (0,15) GHa | 0,85 ± (0,07) GHa | 12,50 ± (0,53) FGa | 10,00 ± (0,7) FGa | 0,56 ± (0,63) Fa | 0,88 ± (0,24) Fa | 41,65 ± (2,74) Oa | 48,64 ± (1,47) Oa |
| | LAPT 22 | 0,71 ± (0,02) LMa | 0,44 ± (0,26) LMa | 1,00 ± (0,14) ABa | 0,85 ± (0,15) ABa | 0,00 ± (0,00) UVa | 5,00 ± (0,00) UVa | 0,34 ± (0,15) Fa | 0,54 ± (0,18) Fa | 48,50 ± (6,44) Jb | 37,75 ± (2,48) Ja |
| Plaqueamento de alíquotas das microplacas | LAPM 23 | 1,09 ± (0,11) GHa | 0,25 ± (0,18) GHb | 1,10 ± (0,14) Sa | 1,05 ± (0,07) Sa | 15,00 ± (0,2) MNa | 0,00 ± (0,00) MNa | 0,79 ± (0,96) Fa | 0,60 ± (0,35) Fa | 45,15 ± (3,40) Xa | 49,75 ± (0,04) Xa |
| | LAPM 24 | 0,47 ± (0,04) VXa | 0,24 ± (0,02) VXa | 1,25 ± (0,35) Ua | 0,80 ± (0,00) Ub | 32,50 ± (0,6) QRa | 2,65 ± (0,74) QRb | 0,34 ± (0,15) Fa | 0,39 ± (0,22) Fa | 53,58 ± (5,46) Tua | 54,05 ± (0,34) Tua |
| | LAPM 26 | 1,07 ± (0,01) Va | 0,91 ± (0,22) Va | 1,25 ± (0,14) Qa | 1,10 ± (0,14) Qa | 15,00 ± (0,00) Hla | 5,00 ± (0,7) Hla | 0,46 ± (0,18) Fa | 0,68 ± (0,12) Fa | 46,92 ± (2,35) Va | 47,69 ± (4,85) Va |
| | LAPM 27 | 3,72 ± (0,08) Ca | 0,93 ± (0,11) Cb | 1,45 ± (0,07) Oa | 1,00 ± (0,14) Ob | 68,42 ± (0,00) Ba | 61,18 ± (0,5) Ba | 0,34 ± (0,24) Fa | 0,65 ± (0,02) Fa | 51,79 ± (1,73) Za | 44,22 ± (1,46) Za |
| | LAPM 28 | 0,78 ± (0,04) LMa | 0,30 ± (0,01) LMB | 1,05 ± (0,07) Xa | 0,90 ± (0,14) Xa | 10,55 ± (0,42) STa | 0,00 ± (0,00) STa | 0,45 ± (0,56) Bb | 2,17 ± (0,16) Ba | 43,81 ± (1,86) La | 44,09 ± (0,60) La |
| | LAPM 29 | 1,11 ± (0,04) Sa | 1,04 ± (0,02) Sa | 1,25 ± (0,21) Oa | 1,20 ± (0,00) Oa | 17,50 ± (0,60) Hla | 2,50 ± (0,5) Hla | 0,11 ± (0,00) Ga | 0,45 ± (0,16) Ga | 49,50 ± (1,43) CDa | 49,06 ± (1,84) CDa |
| | LAPM 30 | 0,78 ± (0,08) IJa | 0,48 ± (0,08) IJa | 1,05 ± (0,21) Va | 0,95 ± (0,21) Va | 0,00 ± (0,00) UVa | 5,00 ± (0,00) UVa | 0,95 ± (0,51) Ea | 1,35 ± (0,32) Ea | 41,70 ± (6,20) Ga | 42,51 ± (1,72) Ga |
| | LAPM 31 | 1,15 ± (0,08) Sa | 0,99 ± (0,02) Sa | 1,15 ± (0,07) Sa | 1,00 ± (0,14) Sa | 27,50 ± (3,54) BCa | 0,00 ± (0,00) BCb | 0,39 ± (0,00) Fa | 0,66 ± (0,09) Fa | 52,76 ± (5,79) Tb | 41,48 ± (11,1) Ta |
| | LAPM 32 | 1,15 ± (0,03) Sa | 0,99 ± (0,05) Sa | 1,25 ± (0,07) Pa | 1,15 ± (0,07) Pa | 20,00 ± (0,00) Hla | 0,00 ± (0,00) Hla | 0,24 ± (0,03) Fa | 0,51 ± (0,08) Fa | 48,05 ± (0,76) Ib | 37,73 ± (2,50) Ia |
| | LAPM 33 | 0,69 ± (0,00) LMa | 0,44 ± (0,01) LMa | 1,05 ± (0,35) Za | 0,85 ± (0,21) Za | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,34 ± (0,07) Ga | 0,20 ± (0,04) Ga | 49,8 ± (3,98) Qb | 41,66 ± (4,05) Qa |
| | LAPM 34 | 0,85 ± (0,05) LMa | 0,33 ± (0,08) LMB | 1,35 ± (0,21) Oa | 1,15 ± (0,07) Oa | 73,53 ± (4,15) Aa | 68,62 ± (2,77) Aa | 0,55 ± (0,05) Fa | 0,22 ± (0,01) Fa | 38,00 ± (1,80) Ca | 41,00 ± (6,00) Ca |
| | LAPM 36 | 1,86 ± (0,18) La | 1,01 ± (0,14) Lb | 1,85 ± (0,07) Ga | 1,25 ± (0,07) Gb | 23,53 ± (3,10) DEa | 0,00 ± (0,00) DEb | 0,23 ± (0,16) Ha | 0,11 ± (0,08) Ha | 37,16 ± (1,06) Ca | 41,78 ± (4,36) Ca |

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| | LAPM 37 | 1,92 ± (0,14) Ja | 1,15 ± (0,07) Jb | 1,70 ± (0,00) Ga | 1,40 ± (0,28) Ga | 31,37 ± (2,77) BCa | 0,00 ± (0,00) BCb | 0,38 ± (0,46) Ga | 0,17 ± (0,08) Ga | 44,52 ± (5,78) Ea | 36,94 ± (1,55) Ea |
| | | | | | | | | | | | |
| | LAPM 38 | 1,24 ± (0,04) Qa | 1,08 ± (0,16) Qa | 1,65 ± (0,07) Ea | 1,65 ± (0,35) Ea | 23,53 ± (3,10) CDa | 32,35 ± (0,10) CDa | 0,31 ± (0,02) Ga | 0,26 ± (0,04) Ga | 51,28 ± (3,30) Lb | 37,01 ± (2,76) La |
| | LAPM 39 | 0,75 ± (0,30) LMa | 0,36 ± (0,02) LMa | 1,50 ± (0,00) La | 1,30 ± (0,14) La | 5,55 ± (0,85) HIa | 11,76 ± (0,6) HIa | 0,35 ± (0,11) Fa | 0,65 ± (0,02) Fa | 49,82 ± (3,81) Gb | 34,27 ± (0,53) Ga |
| | LAPM 40 | 0,29 ± (0,01) ZAa | 0,40 ± (0,10) ZAa | 1,55 ± (0,35) La | 1,25 ± (0,07) La | 17,65 ± (0,00) BCa | 14,70 ± (4,16) BCa | 0,33 ± (0,48) Fa | 0,46 ± (0,18) Fa | 45,38 ± (2,08) La | 43,03 ± (7,25) La |
| | LAPM 41 | 0,75 ± (0,01) EFa | 0,66 ± (0,05) EFa | 0,90 ± (0,28) Aa | 0,95 ± (0,07) Aa | 0,00 ± (0,00) HIa | 18,42 ± (0,60) HIa | 0,38 ± (0,04) Fa | 0,65 ± (0,02) Fa | 47,14 ± (5,67) Ra | 45,00 ± (5,46) Ra |
| | LAPM 42 | 1,10 ± (0,03) Ra | 1,13 ± (0,09) Ra | 1,70 ± (0,00) Ea | 1,60 ± (0,14) Ea | 0,00 ± (0,15) QRa | 11,11 ± (0,70) QRa | 0,20 ± (0,12) Já | 0,00 ± (0,08) Ja | 44,01 ± (1,18) Fa | 37,72 ± (4,05) Fa |
| | LAPM 43 | 0,75 ± (0,02) GHa | 0,61 ± (0,33) GHa | 1,85 ± (0,07) Fa | 1,40 ± (0,14) Fb | 74,34 ± (3,00) Pa | 22,22 ± (0,40) Pb | 0,45 ± (0,31) Ga | 0,14 ± (0,04) Ga | 43,52 ± (5,89) Ia | 42,35 ± (6,73) Ia |
| | LAPM 44 | 3,12 ± (0,02) Ca | 1,83 ± (0,80) Cb | 2,05 ± (0,07) Ca | 1,60 ± (0,00) Cb | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,20 ± (0,12) Ga | 0,37 ± (0,36) Ga | 44,49 ± (3,34) Ia | 41,55 ± (2,75) Ia |
| | LAPM 45 | 0,43 ± (0,03) RSa | 0,37 ± (0,00) RSa | 0,85 ± (0,07) IJa | 0,80 ± (0,14) IJa | 34,22 ± (0,60) QRa | 0,00 ± (0,00) QRb | 0,41 ± (0,25) Fa | 0,55 ± (0,11) Fa | 44,94 ± (8,93) Ga | 39,94 ± (0,79) Ga |
| | LAPM 46 | 0,45 ± (0,04) RSa | 0,35 ± (0,09) RSa | 1,20 ± (0,00) Qa | 1,10 ± (0,28) Qa | 41,65 ± (0,80) Sa | 47,20 ± (3,95) Sa | 0,38 ± (0,12) Ga | 0,20 ± (0,04) Ga | 47,95 ± (0,30) NOa | 55,81 ± (1,37) NOb |
| | LAPM 47 | 0,43 ± (0,00) VXa | 0,29 ± (0,00) VXa | 1,60 ± (0,26) La | 1,25 ± (0,21) La | 28,95 ± (3,71) BCa | 0,00 ± (0,00) BCb | 0,54 ± (0,07) Ga | 0,02 ± (0,04) Ga | 50,59 ± (1,93) QRa | 64,69 ± (3,84) QRb |
| | LAPM 48 | 0,54 ± (0,26) NOa | 0,43 ± (0,03) NOa | 1,15 ± (0,21) Qa | 1,15 ± (0,07) Qa | 23,68 ± (0,40) Sb | 64,76 ± (5,16) Sa | 1,21 ± (0,76) Fa | 0,23 ± (0,08) Fb | 50,76 ± (4,28) NOa | 53,84 ± (0,94) NOa |
| | LAPM 49 | 0,66 ± (0,02) PQa | 0,26 ± (0,08) PQa | 1,05 ± (0,21) Ta | 1,05 ± (0,07) Ta | 25,90 ± (0, 40) Xb | 52,50 ± (0,60) Xa | 0,40 ± (0,07) Fa | 0,59 ± (0,36) Fa | 36,36 ± (0,86) Ca | 43,37 ± (0,80) Ca |
| | LAPM 50 | 0,53 ± (0,04) NOa | 0,42 ± (0,00) NOa | 1,50 ± (0,20) Na | 1,15 ± (0,21) Na | 29,41 ± (3,20) Tb | 56,58 ± (9,30) Ta | 0,37 ± (0,28) Ga | 0,23 ± (0,16) Ga | 49,49 ± (6,40) RFa | 50,22 ± (3,53) EFa |

| | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| | LAPM 51 | 0,44 ± (0,12) ZAa | 0,18 ± (0,06) ZAa | 1,00 ± (0,00) Za | 0,90 ± (0,00) Za | 27,34 ± (0,,30) QRa | 8,18 ± (0,13) QRa | 0,20 ± (0,21) Ga | 0,43 ± (0,36) Ga | 51,97 ± (4,78) DEa | 57,80 ± (1,18) DEa |
| | LAPM 52 | 0,53 ± (0,04) IJa | 0,71 ± (0,27) IJa | 1,35 ± (0,35) Oa | 1,20 ± (0,14) Oa | 75,60 ± (0,84) Ea | 50,00 ± (0,2) Eb | 0,62 ± (0,21) Fa | 0,16 ± (0,09) Fa | 52,24 ± (4,35) DEa | 57,95 ± (6,40) DEa |
| | LAPM 53 | 1,12 ± (0,14) ABa | 0,60 ± (0,03) ABb | 1,20 ± (0,14) Qa | 1,10 ± (0,14) Qa | 60,55 ± (0,77) Ja | 52,50 ± (3,53) Ja | 0,25 ± (0,28) Fa | 0,48 ± (0,10) Fa | 62,68 ± (3,66) NOPa | 58,28 ± (0,25) NOPa |
| Plaqueamento do enriquecimento | LAPER 54 | 0,67 ± (0,04) CDa | 0,98 ± (0,10) CDa | 1,30 ± (0,00) Oa | 1,25 ± (0,07) Oa | 75,00 ± (0,00) Ma | 32,50 ± (0,70) Mb | 0,26 ± (0,12) Fa | 0,70 ± (0,41) Fa | 55,72 ± (0,47) RSa | 49,94 ± (0,30) RSa |
| | LAPER 55 | 1,31 ± (0,07) ABa | 0,49 ± (0,06) ABb | 1,20 ± (0,14) Ra | 0,95 ± (0,07) Ra | 0,00 ± (0,00) Ga | 22,50 ± (0,80) FGa | 0,00 ± (0,02) Ga | 0,53 ± (0,02) Ga | 60,74 ± (0,37) DEb | 50,10 ± (7,44) DEa |
| | LAPER 56 | 3,63 ± (0,41) Da | 0,91 ± (0,03) Db | 1,80 ± (0,28) Fa | 1,45 ± (0,07) Fa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,27 ± (0,02) Ea | 0,44 ± (0,17) Ea | - | - |
| | LAPER 57 | 0,70 ± (0,05) IJa | 0,55 ± (0,03) IJa | 1,00 ± (0,00) Za | 0,90 ± (0,00) Za | 30,79 ± (1,11) VXa | 5,26 ± (0,43) VXb | 0,45 ± (0,14) Fa | 0,79 ± (0,36) Fa | 52,31 ± (1,33) Mb | 36,80 ± (1,49) Ma |
| | LAPER 58 | 2,19 ± (0,06) Ga | 1,60 ± (0,00) Gb | 1,55 ± (0,07) Ja | 1,40 ± (0,00) Ja | 72,50 ± (9,60) ABa | 0,00 ± (0,00) ABb | 0,77 ± (0,48) Fa | 0,65 ± (0,25) Fa | 55,81 ± (1,04) VXa | 52,18 ± (2,10) VXa |
| | LAPER 59 | 1,05 ± (0,05) CDa | 0,51 ± (0,06) Cdb | 1,15 ± (0,07) Ra | 1,05 ± (0,15) Ra | 15,00 ± (0,00) Ub | 70,00 ± (7,07) Ua | 0,36 ± (0,09) Ga | 0,30 ± (0,35) Ga | 53,44 ± (2,55) PQa | 51,98 ± (1,74) PQa |
| | LAPER 60 | 3,37 ± (0,21) Ba | 1,92 ± (0,35) Bb | 2,20 ± (0,14) Ba | 1,70 ± (0,14) Bb | 60,00 ± (1,8,) CDa | 0,00 ± (0,00) Cdb | 0,91 ± (0,26) Fa | 0,49 ± (0,03) Fa | 61,87 ± (3,27) MNb | 52,03 ± (1,21) MNa |
| | LAPER 61 | 0,91 ± (0,38) ABa | 0,79 ± (0,41) ABa | 1,35 ± (0,21) Oa | 1,15 ± (0,25) Oa | 68,21 ± (4,54) Na | 30,00 ± (0,20) Nb | 0,08 ± (0,12) Fb | 0,79 ± (0,79) Fa | 65,76 ± (1,97) UVb | 50,55 ± (5,45) UVa |
| | LAPER 62 | 1,13 ± (0,09) CDa | 0,49 ± (0,14) Cdb | 1,25 ± (0,21) Pa | 1,15 ± (0,07) Pa | 55,00 ± (1,20) Qa | 36,05 ± (8,55) Qa | 0,36 ± (0,04) Fa | 0,44 ± (0,21) Fa | 46,13 ± (5,72) Sa | 47,18 ± (0,37) Sa |
| | LAPER 63 | 0,85 ± (0,04) CDa | 0,66 ± (0,04) CDa | 1,15 ± (0,35) Qa | 1,15 ± (0,07) Qa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,35 ± (0,14) Ga | 0,08 ± (0,21) Ga | - | - |
| LAPER 64 | 0,52 ± (0,00) NOa | 0,43 ± (0,00) NOa | 1,20 ± (0,14) Pa | 1,20 ± (0,28) Pa | 33,30 ± (2,40) ABa | 37,50 ± (0,70) ABa | 0,40 ± (0,07) Fa | 0,35 ± (0,25) Fa | - | - | |

| | | | | | | | | | | |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| LAPER 66 | 1,87 ± (0,14) Ha | 1,72 ± (0,02) Ha | 1,60 ± (0,00) Ia | 1,40 ± (0,28) Ia | 60,85 ± (8,27) Ca | 67,50 ± (3,53) Ca | 0,17 ± (0,16) Fa | 0,74 ± (0,04) Fa | 57,38 ± (2,63) NOB | 47,20 ± (1,87) NOa |
| LAPER 67 | 1,62 ± (0,05) Ua | 0,48 ± (0,17) Ub | 1,30 ± (0,14) Qa | 1,00 ± (0,28) Qa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,69 ± (0,02) Fa | 0,05 ± (0,08) Fa | 61,78 ± (1,10) TUVa | 61,35 ± (7,53) TUVa |
| LAPER 68 | 1,11 ± (0,09) CDa | 0,46 ± (0,06) Cdb | 1,15 ± (0,07) Ra | 1,10 ± (0,14) Ra | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,73 ± (0,67) Fa | 0,83 ± (0,71) Fa | 64,87 ± (1,23) JLb | 48,28 ± (3,33) JLa |
| LAPER 69 | 0,67 ± (0,01) PQa | 0,21 ± (0,05) PQb | 1,15 ± (0,07) Ra | 1,10 ± (0,28) Ra | 22,50 ± (3,53) FGa | 0,00 ± (0,00) FGa | 0,31 ± (0,02) Ga | 0,24 ± (0,36) Ga | 55,93 ± (1,52) TUa | 50,75 ± (0,09) TUa |
| LAPER 70 | 0,83 ± (0,38) LMA | 0,22 ± (0,01) LMB | 1,15 ± (0,07) Ta | 0,95 ± (0,21) Ta | 11,11 ± (0,70) QRa | 22,90 ± (0,30) QRa | 0,65 ± (0,08) Fa | 0,52 ± (0,15) Fa | 46,79 ± (0,14) NOa | 58,04 ± (4,57) NOB |
| LAPER 71 | 1,20 ± (0,18) CDa | 0,30 ± (0,08) Cdb | 1,10 ± (0,14) Va | 0,90 ± (0,18) Va | 60,53 ± (3,71) CDa | 0,00 ± (0,00) Cdb | 0,55 ± (0,00) Fa | 0,38 ± (0,19) Fa | 50,31 ± (2,20) NOa | 53,60 ± (3,11) NOa |
| LAPER 72 | 0,98 ± (0,14) Za | 0,83 ± (0,24) Za | 1,05 ± (0,07) Ta | 1,05 ± (0,07) Ta | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,34 ± (0,24) Ga | 0,18 ± (0,09) Ga | - | - |
| LAPER 73 | 0,96 ± (0,15) CDa | 0,52 ± (0,01) CDa | 1,20 ± (0,00) Sa | 0,95 ± (0,21) Sa | 12,50 ± (0,60) OPa | 0,00 ± (0,00) OPa | 0,56 ± (0,21) Ga | 0,11 ± (0,16) Ga | 61,11 ± (5,03) QTSa | 60,77 ± (7,90) QRSa |
| LAPER 74 | 0,33 ± (0,24) BCa | 0,19 ± (0,06) BCa | 1,15 ± (0,21) Va | 0,85 ± (0,07) Va | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,71 ± (0,05) Fa | 0,94 ± (0,31) Fa | 55,70 ± (8,33) DEFa | 62,76 ± (9,05) DEFa |
| LAPER 76 | 0,42 ± (0,00) ZAa | 0,18 ± (0,14) ZAa | 1,05 ± (0,07) Ua | 1,00 ± (0,18) Ua | 0,00 ± (0,00) OPa | 12,50 ± (0,60) OPa | 0,27 ± (0,39) Fa | 0,46 ± (0,15) Fa | 47,25 ± (0,83) GHa | 52,56 ± (8,41) GHa |
| LAPER 77 | 0,43 ± (0,03) BCa | 0,08 ± (0,01) BCa | 1,05 ± (0,07) Xa | 0,90 ± (0,14) Xa | 35,00 ± (1,20) QRa | 0,00 ± (0,00) QRb | 0,23 ± (0,00) Ga | 0,35 ± (0,14) Ga | 59,42 ± (2,84) Hla | 53,57 ± (3,38) Hla |
| LAPER 78 | 0,25 ± (0,04) BCa | 0,29 ± (0,05) BCa | 1,05 ± (0,07) Ua | 1,00 ± (0,14) Ua | 45,25 ± (1,00) CDa | 21,45 ± (6,80) Cdb | 0,25 ± (0,11) Fb | 1,24 ± (0,03) Fa | - | - |
| LAPER 79 | 0,77 ± (0,02) PQa | 0,15 ± (0,07) PQb | 1,10 ± (0,14) Ua | 0,95 ± (0,15) Ua | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,26 ± (0,04) Ha | 0,14 ± (0,04) Ha | - | - |
| LAPER 80 | 0,59 ± (0,14) PQa | 0,30 ± (0,21) PQa | 0,60 ± (0,14) LMA | 0,90 ± (0,14) LMA | 0,00 ± (0,00) UVa | 5,00 ± (0,7) UVa | 0,47 ± (0,00) Fa | 0,37 ± (0,19) Fa | 56,85 ± (0,75) JLa | 56,45 ± (0,21) JLa |
| LAPER 81 | 0,65 ± (0,02) LMA | 0,38 ± (0,21) LMA | 0,95 ± (0,21) EFa | 0,80 ± (0,14) EFa | 0,00 ± (0,00) JLa | 15,80 ± (1,13) JLa | 0,31 ± (0,19) Ga | 0,26 ± (0,12) Ga | 62,34 ± (0,55) XZAa | 61,45 ± (2,73) XZAa |

| | | | | | | | | | | |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| LAPER 82 | 0,97 ± (0,39) LMa | 0,10 ± (0,06) LMb | 0,80 ± (0,14) IJa | 0,80 ± (0,14) IJa | 10,00 ± (0,10) BCa | 17,50 ± (0,70) BCa | 0,56 ± (0,53) Fa | 0,27 ± (0,39) Fa | 63,37 ± (2,93) BCDa | 60,92 ± (6,85) BCDa |
| LAPER 83 | 0,71 ± (0,02) RSa | 0,11 ± (0,00) RSb | 1,10 ± (0,00) Xa | 0,85 ± (0,07) Xa | 0,00 ± (0,00) DEb | 23,68 ± (0,40) DEa | 0,47 ± (0,00) Fa | 0,47 ± (0,16) Fa | 60,81 ± (0,54) STa | 55,14 ± (5,87) STa |
| LAPER 84 | 0,34 ± (0,10) VXa | 0,37 ± (0,07) VXa | 0,95 ± (0,07) ABa | 0,90 ± (0,00) ABa | 37,50 ± (3,53) CDa | 27,50 ± (0,60) CDa | 0,67 ± (0,05) Fa | 0,58 ± (0,18) Fa | 38,47 ± (1,58) Aa | 38,93 ± (1,03) Aa |
| LAPER 85 | 0,74 ± (0,12) NOa | 0,19 ± (0,07) NOb | 0,90 ± (0,14) GHa | 0,80 ± (0,14) GHa | 22,50 ± (0,80) CDa | 45,00 ± (4,10) CDa | 0,17 ± (0,07) Ga | 0,34 ± (0,07) Ga | 59,11 ± (1,94) QRSa | 62,75 ± (3,95) QRSa |
| LAPER 86 | 0,71 ± (0,03) NOa | 0,23 ± (0,07) NOb | 1,10 ± (0,14) ABa | 0,75 ± (0,07) ABa | 53,68 ± (8,93) GHa | 0,00 ± (0,00) GHb | 0,00 ± (0,08) La | 0,05 ± (0,00) La | 58,03 ± (2,82) ABCa | 60,30 ± (3,79) ABCa |
| LAPER 87 | 0,79 ± (0,04) PQa | 0,13 ± (0,04) PQb | 1,00 ± (0,00) CDa | 0,80 ± (0,14) CDa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,48 ± (0,43) Ga | 0,17 ± (0,16) Ga | - | - |
| LAPER 88 | 1,23 ± (0,13) Ra | 1,02 ± (0,01) Ra | 0,30 ± (0,14) HIa | 0,30 ± (0,00) HIa | 16,00 ± (0,00) QRa | 18,42 ± (0,00) QRa | 0,67 ± (0,08) Fa | 0,34 ± (0,24) Fa | 65,89 ± (0,64) EFGa | 60,20 ± (2,19) EFGa |
| LAPER 89 | 1,61 ± (0,29) Ia | 1,59 ± (0,17) Ia | 0,40 ± (0,00) BCa | 0,40 ± (0,14) BCa | 55,26 ± (9,10) Ra | 34,21 ± (3,71) Ra | 0,69 ± (0,22) Fa | 0,51 ± (0,05) Fa | 62,30 ± (1,79) XZa | 55,21 ± (1,56) XZa |
| LAPER 90 | 0,91 ± (0,00) CDa | 0,75 ± (0,10) CDa | 0,30 ± (0,00) JLa | 0,25 ± (0,21) JLa | 52,50 ± (3,53) Ja | 60,52 ± (3,72) Ja | 1,10 ± (0,04) Fa | 0,44 ± (0,04) Fa | 33,06 ± (0,88) Pa | 57,65 ± (0,95) Pb |
| LAPER 91 | 0,67 ± (0,12) TUa | 0,06 ± (0,06) TUb | 1,20 ± (0,14) Xa | 0,75 ± (0,11) Xb | 0,00 ± (0,00) XZa | 2,50 ± (3,53) XZa | 0,28 ± (0,15) Ga | 0,28 ± (0,15) Ga | 55,58 ± (0,00) DEa | 55,71 ± (1,68) DEa |
| LAPER 92 | 0,37 ± (0,00) BCa | 0,15 ± (0,12) BCa | 1,00 ± (0,00) Xa | 0,95 ± (0,21) Xa | 25,66 ± (0,93) BCa | 0,00 ± (0,00) BCb | 0,16 ± (0,15) Fb | 0,94 ± (0,12) Fa | 59,28 ± (1,19) UVa | 57,54 ± (1,86) UVa |
| LAPER 93 | 0,83 ± (0,09) IJa | 0,47 ± (0,07) IJa | 0,95 ± (0,07) Za | 0,95 ± (0,21) Za | 20,00 ± (0,00) QRa | 15,00 ± (1,2) QRa | 2,11 ± (0,16) Ca | 0,38 ± (0,04) Cb | 29,89 ± (0,97) Ha | 55,86 ± (6,18) Hb |
| LAPER 94 | 0,64 ± (0,02) IJa | 0,58 ± (0,03) IJa | 1,25 ± (0,19) Qa | 1,10 ± (0,28) Qa | 43,68 ± (5,21) RSa | 0,00 ± (0,00) RSb | 0,94 ± (0,32) Fa | 0,65 ± (0,25) Fa | 30,48 ± (0,39) Ba | 47,52 ± (1,06) Bb |
| LAPER 95 | 0,58 ± (0,13) RSa | 0,22 ± (0,05) RSa | 1,25 ± (0,07) Pa | 1,15 ± (0,07) Pa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,10 ± (0,32) Ha | 0,26 ± (0,04) Ha | 63,42 ± (1,65) UVb | 53,01 ± (5,95) UVa |
| LAPEO 96 | 0,50 ± (0,27) PQa | 0,36 ± (0,05) PQa | 1,10 ± (0,14) Sa | 1,05 ± (0,07) Sa | 27,50 ± (0,70) BCa | 0,00 ± (0,00) BCb | 0,86 ± (0,38) Fa | 0,45 ± (0,31) Fa | 52,17 ± (6,13) ABa | 45,58 ± (0,48) ABa |

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| | LAPEO 97 | 0,93 ± (0,03) CDa | 0,70 ± (0,01) CDa | 0,30 ± (0,14) MNa | 0,20 ± (0,14) MNa | 22,22 ± (7,86) HIa | 0,00 ± (0,00) HIa | 1,18 ± (0,55) Fa | 0,38 ± (0,04) Fb | 63,98 ± (1,09) EFGa | 60,82 ± (0,88) EFGa |
| | LAPER 98 | 0,63 ± (0,02) RSa | 0,15 ± (0,05) RSb | 1,30 ± (0,00) Qa | 1,00 ± (0,00) Qa | 0,00 ± (0,00) OPa | 12,50 ± (0,60) OPa | 0,33 ± (0,14) Ga | 0,14 ± (0,04) Ga | 65,09 ± (4,65) GHIB | 53,65 ± (1,01) GHla |
| | LAPEO 99 | 0,83 ± (0,27) CDa | 0,78 ± (0,02) CDa | 0,90 ± (0,14) EFa | 0,85 ± (0,21) EFa | 15,79 ± (3,43) IJa | 35,79 ± (5,95) IJa | 0,35 ± (0,39) Ga | 0,32 ± (0,07) Ga | 56,33 ± (7,57) DEa | 55,34 ± (2,00) DEa |
| | LAPEO 100 | 0,53 ± (0,00) LMa | 0,54 ± (0,03) LMa | 1,10 ± (0,00) Qa | 1,20 ± (0,28) Qa | 25,65 ± (0,92) QRa | 10,00 ± (0,90) QRa | 0,43 ± (0,14) Fa | 0,85 ± (0,25) Fa | 58,74 ± (4,04) FGa | 53,36 ± (0,05) FGa |
| | LAPEO 101 | 0,29 ± (0,13) BCa | 0,24 ± (0,04) BCa | 0,25 ± (0,21) MNa | 0,25 ± (0,07) MNa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,00 ± (0,00) ABCa | 0,14 ± (0,04) Ia | 0,12 ± (0,27) Ia | 63,83 ± (1,74) HIJa | 68,01 ± (2,67) HIJa |
| | LAPEO 102 | 1,47 ± (0,01) Ua | 0,63 ± (0,04) Ub | 1,20 ± (0,00) Ra | 1,05 ± (0,07) Ra | 2,50 ± (3,53) LMb | 46,18 ± (1,67) LMa | 0,27 ± (0,06) Ha | 0,07 ± (0,28) Ha | 58,73 ± (3,90) DEa | 52,90 ± (3,80) DEa |
| | LAPEO 103 | 1,53 ± (0,21) Ta | 0,60 ± (0,00) Tb | 1,00 ± (0,27) Xa | 0,95 ± (0,07) Xa | 7,50 ± (0,60) TUb | 35,00 ± (0,00) TUa | 0,15 ± (0,11) Ga | 0,39 ± (0,03) Ga | 59,78 ± (7,04) OPa | 54,78 ± (0,49) OPa |
| | LAPEO 104 | 0,63 ± (0,02) LMa | 0,57 ± (0,00) LMa | 1,15 ± (0,21) Va | 0,85 ± (0,07) Va | 2,63 ± (3,71) ABb | 67,50 ± (3,53) ABa | 0,36 ± (0,04) Fa | 0,46 ± (0,09) Fa | 63,47 ± (2,07) QRb | 51,56 ± (1,26) QRa |
| | LAPEO 105 | 0,68 ± (0,12) LMa | 0,45 ± (0,21) LMa | 1,10 ± (0,14) Ra | 1,10 ± (0,14) Ra | 27,89 ± (1,10) IJa | 23,68 ± (3,40) IJa | 0,38 ± (0,21) Fa | 0,50 ± (0,24) Fa | 53,23 ± (0,13) ZAa | 56,17 ± (2,44) ZAa |
| | LAPEO 106 | 0,62 ± (0,17) PQa | 0,26 ± (0,01) PQa | 0,55 ± (0,00) ZAa | 0,30 ± (0,03) ZAa | 53,94 ± (5,57) GHa | 0,00 ± (0,00) GHb | 0,32 ± (0,63) Ga | 0,17 ± (0,00) Ga | - | - |
| | LAPEO 107 | 1,86 ± (0,11) Oa | 0,77 ± (0,56) Ob | 1,25 ± (0,28) ABa | 0,60 ± (0,03) ABb | 25,00 ± (5,30) ABa | 45,61 ± (3,00) ABa | 1,77 ± (0,28) Da | 0,62 ± (0,77) Db | 60,88 ± (0,90) TUVa | 61,74 ± (0,57) TUVa |
| | LAPEO 108 | 1,94 ± (0,62) Ma | 0,85 ± (0,15) Mb | 0,85 ± (0,07) PQa | 0,45 ± (0,07) PQa | 65,76 ± (1,27) Ga | 55,55 ± (7,85) Ga | 0,57 ± (0,00) Fa | 0,72 ± (0,91) Fa | 60,76 ± (4,01) NOPa | 59,30 ± (1,20) NOPa |
| | LAPEO 109 | 2,61 ± (0,08) Fa | 1,45 ± (0,06) Fb | 0,90 ± (0,07) LMa | 0,60 ± (0,28) LMa | 65,63 ± (0,21) Da | 60,76 ± (8,34) Da | 0,37 ± (0,14) Ha | 0,02 ± (0,07) Ha | 53,19 ± (0,77) DEa | 57,60 ± (3,59) DEa |
| | LAPEO 110 | 2,66 ± (0,04) Ea | 1,66 ± (0,34) Eb | 0,95 ± (0,21) NOa | 0,45 ± (0,07) NOb | 65,00 ± (0,00) Ga | 55,26 ± (7,43) Ga | 0,37 ± (0,68) Ga | 0,17 ± (0,00) Ga | 61,96 ± (13,0) JLMa | 57,28 ± (4,01) JLMa |

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| | LAPEO 111 | 0,95 ± (0,37) CDa | 0,68 ± (0,09) CDa | 0,35 ± (0,07) FGa | 0,30 ± (0,18) FGa | 57,00 ± (3,60) Za | 18,42 ± (6,00) Zb | 0,37 ± (0,02) Fa | 0,46 ± (0,24) Fa | 63,05 ± (2,00) EFGa | 63,16 ± (2,03) EFGa |
| | LAPEO 112 | 4,06 ± (1,39) Aa | 2,36 ± (0,99) Ab | 1,85 ± (0,21) Ma | 1,35 ± (0,21) Ma | 71,56 ± (2,99) Ca | 57,72 ± (1,65) Ca | 0,00 ± (0,14) La | 0,32 ± (0,21) La | 53,51 ± (0,02) UVa | 58,76 ± (5,57) UVa |
| | LAPEO 113 | 0,94 ± (0,01) CDa | 0,60 ± (0,00) CDa | 0,40 ± (0,00) DEa | 0,35 ± (0,07) DEa | 45,17 ± (3,30) Ib | 41,62 ± (1,90) Ia | 0,12 ± (0,49) Ia | 0,07 ± (0,00) Ia | 61,89 ± (0,28) JLMa | 57,64 ± (0,14) JLMa |
| | LAPEO 114 | 3,99 ± (0,63) Ba | 1,42 ± (0,06) Bb | 1,85 ± (0,20) Oa | 1,10 ± (0,16) Oa | 29,53 ± (3,40) Vb | 54,09 ± (2,06) Va | 0,00 ± (0,07) Fb | 1,27 ± (0,14) Fa | 62,76 ± (2,69) TUVa | 60,24 ± (3,45) TUVa |
| | LAPEO 115 | 0,89 ± (0,09) ABa | 0,81 ± (0,06) ABa | 0,55 ± (0,07) VXa | 0,35 ± (0,07) VXa | 22,50 ± (1,60) FGa | 3,00 ± (3,71) FGa | 0,21 ± (0,14) Ga | 0,40 ± (0,07) Ga | 64,18 ± (2,00) QRSa | 58,04 ± (1,72) QRSa |
| | LAPEO 116 | 1,39 ± (0,50) Ta | 0,73 ± (0,00) Tb | 0,90 ± (0,12) NOa | 0,50 ± (0,14) NOa | 0,00 ± (0,00) NOb | 47,22 ± (3,93) NOa | 1,12 ± (0,77) Fa | 0,47 ± (0,42) Fa | 62,08 ± (2,97) XZa | 55,52 ± (3,09) XZa |
| | LAPEO 117 | 4,96 ± (0,04) Aa | 1,71 ± (0,01) Ab | 1,60 ± (0,14) Ha | 1,45 ± (0,21) Ha | 13,73 ± (4,13) Zb | 62,49 ± (5,89) Za | 0,42 ± (0,49) Fb | 1,22 ± (1,48) Fa | 42,20 ± (0,76) PQa | 63,37 ± (5,37) PQb |
| | LAPEO 118 | 1,03 ± (0,01) ABa | 0,77 ± (0,03) ABa | 0,55 ± (0,07) TUa | 0,45 ± (0,07) TUa | 0,00 ± (0,00) HIa | 21,67 ± (4,00) HIa | 0,42 ± (0,18) Fa | 0,37 ± (0,11) Fa | 60,28 ± (1,45) NOPa | 60,91 ± (1,12) NOPa |
| | LAPEO 119 | 0,76 ± (0,02) LMa | 0,43 ± (0,14) LMa | 1,30 ± (0,14) Qa | 1,05 ± (0,21) Qa | 35,92 ± (1,30) EFa | 18,42 ± (2,00) EFa | 1,10 ± (0,60) Fa | 0,13 ± (0,00) Fb | 48,92 ± (0,53) GHa | 51,29 ± (3,79) GHa |
| | LAPEO 121 | 4,97 ± (0,01) Aa | 1,72 ± (0,11) Ab | 2,35 ± (0,19) Aa | 1,70 ± (0,00) Ab | 60,00 ± (0,00) Ha | 58,95 ± (1,48) Ha | 0,83 ± (0,84) Fa | 0,59 ± (0,39) Fa | 54,96 ± (0,48) BCa | 54,81 ± (1,58) BCa |
| | LAPEO 122 | 0,43 ± (0,11) RSa | 0,33 ± (0,02) RSa | 1,15 ± (0,21) Qa | 1,15 ± (0,07) Qa | 55,00 ± (0,00) Fa | 66,66 ± (0,00) Fa | 0,35 ± (0,02) Fa | 0,67 ± (0,00) Fa | 54,31 ± (1,19) NOa | 50,13 ± (1,06) NOa |
| | LAPEO 123 | 1,71 ± (0,10) Na | 1,02 ± (0,02) Nb | 0,55 ± (0,07) Za | 0,35 ± (0,07) Za | 5,13 ± (0,18) OPa | 7,85 ± (1,10) OPa | 0,50 ± (0,12) Fa | 0,67 ± (0,11) Fa | 61,71 ± (1,25) TUVa | 61,51 ± (0,16) TUVa |
| | LAPEO 124 | 1,23 ± (0,07) Pa | 1,17 ± (0,01) Pa | 0,65 ± (0,07) RSa | 0,50 ± (0,14) RSa | 10,00 ± (1,10) STa | 0,00 ± (0,00) STa | 0,23 ± (0,00) Fa | 0,61 ± (0,79) Fa | 63,20 ± (0,57) TUVa | 59,65 ± (0,87) TUVa |

Legenda: MMB-Meio mineral para bactérias; G-Glicose; OB- óleo bruto. LAPT (Lagoa aerada plaqueamento total); LAPM (Lagoa aerada plaqueamento das micropilhas); LAPER (Lagoa aerada plaqueamento enriquecimento em meio rico); LAPEO (Lagoa

aerada plaqueamento enriquecimento em meio com óleo). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e minúsculas na mesma linha, foram consideradas estatisticamente iguais, com nível mínimo de significância de 0,05 pelo teste de Tukey.

Anexo 4: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados, avaliado pelo parâmetro Densidade ótica a 600 nm, nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|-----------|-----------------------|----------|--------|--------|
| FONTE_DE_C | 1 | 26716447 | 26716447 | 535505 | 0.0000 |
| ISOLADO | 112 | 204.543.657 | 1826283 | 36.606 | 0.0000 |
| REP | 1 | 0.079013 | 0.079013 | 1584 | 0.2095 |
| FONTE_DE_C*ISOLADO | 112 | 45.133.426 | 0.402977 | 8.077 | 0.0000 |
| erro | 225 | 11225300 | 0.049890 | | |
| Total corrigido | 451 | 287697843 | | | |
| CV (%) = | 26.20 | | | | |
| Média geral: | 0.8524670 | Número de observações | | 452 | |

Anexo 5: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados, avaliado pelo parâmetro biomassa seca (mg/mL), nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|--------|--------|
| FONTE_DE_C | 1 | 284341261 | 284341261 | 67098 | 0.0000 |
| ISOLADO | 112 | 5.700.033.186 | 50893153 | 12.010 | 0.0000 |
| REP | 1 | 8642146 | 8642146 | 2039 | 0.1547 |
| FONTE_DE_C*ISOLADO | 112 | 508.971.239 | 4544386 | 1.072 | 0.3276 |
| erro | 225 | 953482854 | 4237702 | | |
| Total corrigido | 451 | 7455470686 | | | |
| CV (%) = | 19.77 | | | | |
| Média geral: | 104148230 | Número de observações | | 452 | |

Anexo 6: Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante (E24) dos isolados nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|-----------|-----------------------|------------|--------|--------|
| FONTE_DE_C | 1 | 2695323313 | 2695323313 | 19240 | 0.0000 |
| ISOLADO | 112 | 177.139.222.308 | 1581600199 | 11.290 | 0.0000 |
| REP | 1 | 120397253 | 120397253 | 0.859 | 0.3549 |
| FONTE_DE_C*ISOLADO | 112 | 70.176.315.187 | 626574243 | 4.473 | 0.0000 |
| erro | 225 | 31519457947 | 140086480 | | |
| Total corrigido | 451 | 2,81651E+11 | | | |
| CV (%) = | 49.12 | | | | |
| Média geral: | 240980088 | Número de observações | | 452 | |

Anexo 7: Análise de variância (ANOVA) para a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro espalhamento da gota nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|----------|-----------------------|----------|-------|--------|
| FONTA_DE_C | 1 | 0.015419 | 0.015419 | 0.125 | 0.7243 |
| ISOLADO | 112 | 31.504.446 | 0.281290 | 2.275 | 0.0000 |
| REP | 1 | 0.026486 | 0.026486 | 0.214 | 0.6440 |
| FONTA_DE_C*ISOLADO | 112 | 25.417.781 | 0.226944 | 1.835 | 0.0001 |
| erro | 225 | 27824714 | 0.123665 | | |
| Total corrigido | 451 | 84788846 | | | |
| CV (%) = | 9.23 | | | | |
| Média geral: | 38108850 | Número de observações | | 452 | |

Anexo 8: Análise de variância (ANOVA) para a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro redução de tensão superficial nas duas fontes de carbono, glicose e óleo bruto

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|--------|--------|
| FONTA_DE_C | 1 | 96152746 | 96152746 | 6444 | 0.0119 |
| ISOLADO | 102 | 21.148.622.134 | 207339433 | 13.895 | 0.0000 |
| FONTA_DE_C*ISOLADO | 102 | 6134561474 | 60142760 | 4031 | 0.0000 |
| erro | 206 | 3.073.815.153 | 14921433 | | |
| Total corrigido | 411 | 30453151505 | | | |
| CV (%) = | 7.36 | | | | |
| Média geral: | 524571529 | Número de observações | | 412 | |

Anexo 9: Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante (E24) dos cas selecionados nos compostos hidrofóbicos: Querosene, Tolueno, Xileno, Hexano, Hexadecano, óleo lubrificante e óleo diesel.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|---------------------|-----------|-----------------------|------------|-------|--------|
| FASE_ORGÂN | 6 | 15998262700 | 1999782838 | 40303 | 0.0000 |
| BIOSURFAC | 2 | 177.691.411 | 88845706 | 1.791 | 0.1868 |
| BLOCO | 1 | 3153750 | 3153750 | 0.064 | 0.8029 |
| FASE_ORGÂN*BIOSURFA | 16 | 4.307.505.089 | 269219068 | 5.426 | 0.0001 |
| erro | 26 | 1290072600 | 49618177 | | |
| Total corrigido | 53 | 21776685550 | | | |
| CV (%) = | 11.20 | | | | |
| Média geral: | 628916667 | Número de observações | | 54 | |

..