

UNIVERSIDADE POSITIVO

SUELLYN HOMAN

**IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
PETRÓLEO EXTRAÍDAS DA RIZOSFERA DE PLANTAS FITORREMEIADORAS**

CURITIBA

2016

SUELLYN HOMAN

**IMOBILIZAÇÃO DE CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
PETRÓLEO EXTRAÍDAS DA RIZOSFERA DE PLANTAS FITORREMEIADORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Teresinha Maranhão

CURITIBA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca da Universidade Positivo - Curitiba - PR

H763 Homan, Suellyn.  
Imobilização de consórcios de bactérias degradadoras de  
petróleo extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras / Suellyn  
Homan. — Curitiba : Universidade Positivo, 2016.  
159 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Positivo, Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2016.  
Orientadora: Profa. Dra. Leila Teresinha Maranhão.

1. Biotecnologia. 2. Petróleo – derivados - análise. 3.  
Degradação ambiental - rizosfera. 4. Biorremediação I. Maranhão,  
Leila Teresinha. II. Título.

CDU 575

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida e viver com paixão,  
perder com classe e viver com ousadia.  
Pois o triunfo pertence a quem se atreve.  
E a vida é muito bela para ser insignificante.”*

**Charles Chaplin**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Positivo pela infraestrutura disponibilizada e, principalmente, pela concessão de bolsa para a realização e desenvolvimento do Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Teresinha Maranhão pela orientação, incentivos, amizade, apoio e conhecimentos transmitidos ao longo de todos estes anos. Obrigada por sempre acreditar em minha capacidade e por me mostrar o caminho da ciência. Você é, e sempre será, minha inspiração na pesquisa.

Aos meus amados pais, Fernandes e Bernadete Homan, os grandes responsáveis por minha formação pessoal e acadêmica. Obrigada pelo amor, incentivo, motivação incondicional e por jamais medirem esforços para a minha felicidade. Essa vitória é nossa!

A Deus por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e por me dar força e coragem nos momentos mais difíceis.

Ao meu grande companheiro, Pedro Slongo, pelo apoio, confiança, amor, carinho, ajuda e por sempre me encorajar a lutar e nunca desistir de meus sonhos.

Aos meus colegas de profissão e também amigos, Rafael e Walquíria, por toda ajuda, contribuições e apoio para a realização desta pesquisa. Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos Fabiana, Marlon, Agnes e Kaue que tornaram o caminho mais suave e que me apoiaram sempre que necessário.

Aos professores do Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial, pelos conhecimentos transmitidos e contribuições para minha formação pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz Soccol pelas análises, auxílio e identificação molecular dos micro-organismos testados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Alves da Costa Cardoso pelo auxílio durante os procedimentos iniciais de imobilização dos consórcios de micro-organismos.

Aos funcionários da Universidade Positivo, em especial aos laboratoristas Jefferson, Vanessa, Jéssica, Daniele e Francini pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento da presente pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Boticário (LABIM) pelo auxílio e disponibilidade para a realização das análises de densidade óptica.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susan Grace Karp pelas considerações, sugestões e críticas na banca de qualificação desta pesquisa. Obrigada por todas as contribuições para a melhoria do presente trabalho.

A todos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento desta pesquisa, assim como para minha formação pessoal e profissional.

## RESUMO

O petróleo constitui uma das mais importantes fontes de energia mundial, porém também é uma das causas mais agravantes da poluição ambiental, porque são comuns derramamentos, vazamentos e eliminação inadequada de resíduos, em que o petróleo entra em contato com o ambiente, no qual pode persistir por longos períodos. É necessário, portanto, o desenvolvimento de métodos de tratamento, dentre os quais, destaca-se a biorremediação. Esta trata-se de um método eficiente e de baixo custo, caracterizado pelo uso de micro-organismos para degradar contaminantes em compostos com menor toxicidade. Para otimizar este processo, estes micro-organismos podem ser combinados, produzindo-se consórcios, com a possibilidade de degradar completamente os resíduos. Além disso, esses consórcios podem ser imobilizados, a fim de manter a viabilidade celular e a proteção dos micro-organismos. Neste sentido, objetivou-se desenvolver microesferas a partir da imobilização de cinco consórcios de bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras para a degradação de petróleo. Sete bactérias, *Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup> e *Bacillus* sp.<sup>5</sup>, foram analisadas quanto ao potencial de degradação por meio de testes individuais em reatores, para diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48 e 72 horas), sendo mensurados parâmetros como: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, biomassa, densidade óptica e produção de biossurfactante. E a análise da degradação dos hidrocarbonetos foi efetuada por Cromatografia a Gás (CG). Após, por meio das características morfofisiológicas destas bactérias, os consórcios foram definidos. Para cada um deles, produziu-se biomassa bacteriana em biorreator, que foi utilizada para a obtenção de microesferas a partir da imobilização destes consórcios nas matrizes alginato e quitosana. Os resultados demonstram que estas bactérias, produtoras de biossurfactante, são promissoras para a degradação de petróleo. Por meio da CG verificaram-se taxas máximas de degradação de cerca de 83% em 24 horas e de 94% em 48 horas. Constatou-se, em relação aos consórcios, que o crescimento de um micro-organismo não interferiu no crescimento dos demais, indicando ação microbiana conjunta, por meio de complementariedade metabólica. Cabe ressaltar que o produto obtido apresentou tamanhos uniformes e resistência quanto à manutenção da forma esférica e, após o processo de liofilização, constatou-se alta viabilidade celular (cerca de 74%). As microesferas podem constituir uma inovação biotecnológica, permitindo a otimização da biorremediação no tratamento de ambientes contaminados com petróleo.

**Palavras-chave:** Petroderivados. Tratamento. Rizodegradação. Biorremediação. Imobilização.

## ABSTRACT

Petroleum is one of the most important sources of world energy, but is also one of the aggravating causes of environmental pollution, because accidents such as spills, leaks in pipes and inadequate waste disposal are common, where the oil comes into contact with the environment, which may persist for long periods. Thus, the development of treatment methods is necessary, among which stands out bioremediation. This is an efficient and low cost method, characterized by the use of microorganisms to degrade contaminants in less environmentally harmful compounds. To optimize this process, these microorganisms may be combined, yielding consortia with the ability to completely degrade petroleum waste. Moreover, these consortia may be immobilized in order to maintain cell viability and protection of the microorganisms. In this sense, the objective was to develop microspheres from the immobilization of five bacterial consortia extracted from the rhizosphere of phytoremediator plants for petroleum degradation. Seven bacteria, *Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup> and *Bacillus* sp.<sup>5</sup>, were analyzed for petroleum degradation potential through individual tests in reactors along different times, 0, 24, 48 and 72 hours, and parameters such as pH, temperature, dissolved oxygen, conductivity, biomass density and biosurfactant production were measured. Besides was analyzed the hydrocarbon degradation by Gas Chromatography (GC). Then, through the morphological and physiological characteristics of these bacteria, the consortia were defined. For each of them, bacterial biomass was produced in a bioreactor, that was used for obtaining microspheres from the immobilization in alginate and chitosan matrix. The results indicate that these bacteria, producers of biosurfactant, are promising for petroleum degradation. By GC, the maximum rates of degradation were about 83% in 24 hours and 94% in 48 hours. It was found, in relation to the consortium, that the growth of a microorganism did not affect the growth of the other, indicating microbial joint action through metabolic complementarity, for hydrocarbon degradation. It should be noted that the product obtained by the immobilization of these consortia, has uniform size and strength to maintain the spherical shape and after the lyophilization process, there was high cell viability (about 74%). The microspheres can be a biotechnological innovation allowing optimization of the bioremediation process for the treatment of petroleum contaminated environments.

**Key-words:** Petroleum derivatives. Treatment. Rhizodegradation. Bioremediation. Immobilization.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Esquema simplificado da ação dos micro-organismos no processo de biorremediação de ambiente contaminado com petróleo.....24

FIGURA 2 - Esquema simplificado do processo de rizodegradação, em que a planta favorece o crescimento de micro-organismos, em sua rizosfera, que degradam o petróleo.....27

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Esquema representativo da cooperação de forma sinérgica dos micro-organismos (A, B, C, D e E) na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Destaque para os micro-organismos capazes de metabolizar compostos tóxicos, gerando subprodutos que podem ser utilizados como substrato para o crescimento de outros micro-organismos, otimizando, desta forma, o processo de biorremediação.....43

FIGURA 2 - Método de coagulação para formação de microesferas. A - A quitosana é dissolvida em uma solução contendo ácido. B - Com o auxílio de uma seringa é gotejada em uma solução alcalina, onde as microesferas são formadas. C - Aspecto das microesferas contendo micro-organismos encapsulados.....48

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Esquema representativo que demonstra o estabelecimento dos testes de degradação de petróleo pelas bactérias testadas.....61

FIGURA 2 - Esquema representativo dos procedimentos realizados para extração e quantificação dos hidrocarbonetos de petróleo, avaliação da degradação por meio de Cromatografia à gás (CG), bem como a identificação dos compostos.....63

FIGURA 3 - Cromatogramas referentes à degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>;

(b) T24 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (c) C48 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (d) T48 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>;  
 (f) T24 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (h) T48 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (i) C24 -  
*Stenotrophomonas* sp.; (j) T24 - *Stenotrophomonas* sp.; (k) C48 - *Stenotrophomonas* sp.;  
 (l) T48 - *Stenotrophomonas* sp.....78

FIGURA 4 - Cromatogramas referentes às taxas de degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Microbacterium* sp.;  
 (b) T24 - *Microbacterium* sp.; (c) C48 - *Microbacterium* sp.; (d) T48 - *Microbacterium* sp.;  
 (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (f) T24 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (h) T48 -  
*Bacillus* sp.<sup>3</sup>.....79

FIGURA 5 - Cromatogramas referentes às taxas de degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (b) T24 -  
*Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (c) C48 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (d) T48 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (f) T24 -  
*Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (h) T48 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>.....80

## CAPÍTULO 4

FIGURA 1 - Esquema representativo dos procedimentos realizados para a fermentação dos cinco consórcios bacterianos em biorreator.....95

FIGURA 2 - Esquema representativo dos procedimentos utilizados para a imobilização dos consórcios bacterianos, por meio de liofilização da biomassa e preparo de microesferas de alginato e quitosana.....97

FIGURA 3 - Esquema simplificado do processo de secagem das microesferas por meio de diferentes procedimentos para a seleção do método mais eficiente de desidratação.....98

FIGURA 4 - Curvas de crescimento dos consórcios bacterianos, em que densidade óptica está em função do tempo (horas). A - C1 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); B - C2 (*Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); C - C3 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); D - C4 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); E - C5 (*Stenotrophomonas* sp.,

*Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>). Seta - Alimentação do biorreator com substrato.....101

FIGURA 5 - Curvas de crescimento dos consórcios bacterianos, em que a biomassa microbiana está em função do tempo (horas). A - C1 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); B - C2 (*Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); C - C3 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); D - C4 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); E - C5 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>).....111

FIGURA 6 - Biomassa do consórcio bacteriano C4 liofilizada. A- Aspecto geral. B - Detalhes do produto obtido em microscópio estereoscópio.....113

FIGURA 7 - Aspecto das microesferas de alginato e quitosana contendo o consórcio bacteriano.....114

FIGURA 8 - Microesferas liofilizadas, contendo consórcio de micro-organismos degradadores de petróleo (produto pronto para aplicação em ambientes contaminados).....115

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Principais aspectos de técnicas de tratamento para a remediação de solos contaminados com petróleo relatados na base de dados “Web of Science” no período de 1995 a 2015. COV - Compostos Orgânicos Voláteis.....19

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Pesquisas sobre uso de consórcios na biodegradação de petróleo e derivados no período de 2005 a 2015, disponíveis na base “Web of Science”.....40

TABELA 2 - Patentes de invenção que utilizam consórcios de micro-organismos para degradação de petróleo seguidas pela relação de gêneros e/ou espécies utilizadas e ano de publicação.....44

TABELA 3 - Patentes de invenção que utilizam um micro-organismo individualmente para a degradação de petróleo com a relação do gênero e/ou espécie de cada micro-organismo utilizado, bem como seu ano de publicação.....46

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Resultados referentes aos parâmetros analisados: pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE) durante os testes de degradação de petróleo com as bactérias nos diferentes intervalos de tempo (TB) e em comparação aos controles (TC).....65

TABELA 2 - Resultados referentes aos parâmetros analisados: biomassa por gravimetria (BIO) e densidade óptica ( $DO_{610nm}$ ) durante os testes de degradação de petróleo com as bactérias nos diferentes intervalos de tempo (TB) e em comparação aos controles (TC).....67

TABELA 3 - Teste qualitativo da produção de biossurfactante pelas sete bactérias testadas.....	71
--	----

TABELA 4 - Médias $\pm$ desvios-padrão das áreas dos compostos de hidrocarbonetos de petróleo nos tratamentos com bactérias (TB) e controle (TC), seguidas por porcentagem de degradação das áreas e diferenças estatísticas. TR - Tempo de retenção; DEG - Degradação.....	73
---	----

TABELA 5 - Valores de r dos parâmetros pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), biomassa (BIO) e densidade óptica (DO) para a avaliação de suas interações durante o processo de biorremediação por meio da Correlação de Spearman.....	82
--	----

#### **CAPÍTULO 4**

TABELA 1 - Consórcios bacterianos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.....	99
--	----

TABELA 2 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C1.....	102
---	-----

TABELA 3 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C2.....	103
---	-----

TABELA 4 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C3.....	105
---	-----

TABELA 5 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C4.....	107
---	-----

TABELA 6 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C5.....	109
---	-----

TABELA 7 - Valores de biomassa, úmida e seca, concentração final em bases úmida e seca e viabilidade celular da biomassa seca liofilizada do processo de fermentação dos consórcios bacterianos para a degradação de petróleo.....	112
--	-----

TABELA 8 - Médias±desvios-padrão do peso das microesferas antes (peso úmido) e após o processo de liofilização (peso seco) dos consórcios bacterianos (n=2).....115

TABELA 9 - Contagem de células (céls.mL<sup>-1</sup>) após inoculação das microesferas do consórcio de micro-organismos em meio mineral enriquecido em diferentes intervalos de tempo. R1 - Repetição um; R2 - Repetição dois; R3 - Repetição três.....116

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
NA	Ágar Nutriente
BIO	Biomassa por gravimetria
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CE	Condutividade Elétrica
céls.mL <sup>-1</sup>	Células por mililitro
CG	Cromatografia a Gás
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COV	Compostos orgânicos voláteis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
FeCl <sub>2</sub> .1H <sub>2</sub> O	Cloreto de Ferro Hidratado
g	Gramma
g.L <sup>-1</sup>	Gramas por litro
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido Fosfórico
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio Dibásico Anidro P.A. ACS
L	Litro
L.min <sup>-1</sup>	Litros por minuto

m	Metro
mg	Miligrama
mg.L <sup>-1</sup>	Miligramas por litro
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
min	Minuto
mL	Mililitro
mL.min <sup>-1</sup>	Mililitros por minuto
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de Manganês
mS.cm <sup>-1</sup>	Milisiemens por centímetro
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sódio Anidro
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
°C.min <sup>-1</sup>	Grau Celsius por minuto
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
R1	Repetição um
R2	Repetição dois
R3	Repetição três
rpm	Rotações por minuto
TB	Tratamento com bactéria
TC	Tratamento controle
T	Temperatura
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC.mL <sup>-1</sup>	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Zinco



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2 CAPÍTULO I</b> .....	14
IMPORTÂNCIA DA RIZOSFERA PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO .....	14
Introdução .....	15
Técnicas de Tratamento .....	16
Biorremediação .....	24
Rizodegradação .....	26
Conclusão .....	28
Agradecimentos .....	28
Referências .....	28
<b>3 CAPÍTULO II</b> .....	35
Biorremediação de solos contaminados com petróleo a partir da imobilização de consórcios de micro-organismos .....	35
1. Introdução .....	36
2. Consórcios microbianos e degradação de petróleo .....	38
3. Imobilização dos consórcios de micro-organismos .....	47
4. Conclusão .....	49
Agradecimentos .....	49
Referências .....	50
<b>4 CAPÍTULO III</b> .....	58
Seleção de bactérias degradadoras de petróleo extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras .....	58
Introdução .....	58
Material e métodos .....	60
Resultados e discussão .....	64
Conclusões .....	85
Referências .....	85
<b>5 CAPÍTULO IV</b> .....	92
Imobilização de consórcios de bactérias degradadoras de petróleo extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras .....	92
Introdução .....	92

Material e métodos .....	94
Resultados e discussão .....	99
Conclusões.....	116
Referências .....	117
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	123
6.1 Sugestões .....	124
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125
ANEXO I.....	146
ANEXO II .....	150
ANEXO III.....	156

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo, composto de origem fóssil, de cor escura e consistência viscosa, trata-se de uma mistura complexa de hidrocarbonetos e quantidades variáveis de diferentes compostos não hidrocarbônicos, que levou milhões de anos para ser formado nas rochas sedimentares (MARANHO et al., 2006; ANDRADE et al., 2010; TONINI et al., 2010). Juntamente com o carvão e gás natural, constitui um dos principais vetores da matriz energética mundial, tratando-se de uma fonte de energia primária, porém não renovável (AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA, 2007; BARROS, 2007). Sua exploração tem se tornado crescente ao longo das últimas décadas, devido à industrialização e à expansão da população mundial (BANKOVIĆ-ILIĆ et al., 2012; SPEIGHT, 2014).

Devido à intensa exploração, refino, armazenamento, transporte e distribuição de petróleo, são comuns acidentes em que o mesmo entra em contato com o ambiente, causando a contaminação dos ecossistemas (FERRERA-CERRATO et al., 2006; GERHARDT et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; INCKOT et al., 2011; MOREIRA et al., 2013; BRAMLEY-ALVES et al., 2014). Essa contaminação pode ser resultante de derrames acidentais, vazamentos em tanques e tubulações, abandonos de sítios de refinarias, uso generalizado de petróleo, além da eliminação inadequada de resíduos, fatores que afetam negativamente todos os componentes bióticos e abióticos do ambiente (FINOTTI; CAICEDO, 2001; WHITE et al., 2006; GUEDES et al., 2010; MALIK et al., 2012; LIU et al., 2013).

Perante esta situação, há a necessidade de desenvolver técnicas de remediação mais eficientes, mas com menores custos, que possam reduzir ou degradar contaminantes presentes no solo, buscando a descontaminação ambiental (CUNNINGHAM et al., 1996; FARIAS et al., 2009). Dentre essas técnicas, destaca-se a fitorremediação (JACQUES et al., 2007; FARIAS et al., 2009), que utiliza sistemas vegetais e biota associada para recuperar águas e solos contaminados (CUNNINGHAM et al., 1996; KAIMI, 2006). A estratégia fitorremediadora empregada pelas plantas, quando se trata de ambientes contaminados por petróleo, é a rizodegradação (MA et al., 2009; ALI et al., 2013), na qual a planta favorece o crescimento de micro-organismos na rizosfera, região do solo sob influência das raízes, e onde ocorre a maior parte das interações entre planta e micro-organismos (MACEK et al., 2000; MCGUINNESS; DOWLING, 2009). A planta disponibiliza oxigênio e exsudatos (nutrientes), e os micro-organismos, por sua vez, são os agentes degradadores do petróleo, utilizando-o como fonte de carbono, facilitando ainda, o crescimento e desenvolvimento das plantas em condições

de estresse, como a poluição por petróleo (SICILIANO; GERMIDA, 1998; KHAN, 2005; SANTOS et al., 2007; GERHARDT et al., 2009; MENDES et al., 2013).

Embora vários componentes do petróleo possam ser degradados por micro-organismos individualmente, hidrocarbonetos mais complexos necessitam da cooperação sinérgica entre várias espécies de micro-organismos, o que pode ser favorecido pelo estabelecimento de consórcios (bioaumentação) (BENTO et al., 2003; JACQUES et al., 2007; MAQBOOL et al., 2012). O bioaumentação visa aumentar as taxas de degradação, por meio do fornecimento de biomassa bacteriana para degradar o petróleo do local contaminado (MAQBOOL et al., 2012). O uso desses consórcios, porém, é dependente da viabilidade das bactérias inoculadas, as quais podem ser imobilizadas para otimização do processo (HALL et al., 1998; MAQBOOL et al., 2012). Deste modo, a hipótese que norteia essa pesquisa é de que a imobilização dos consórcios de bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras pode otimizar o processo de degradação de petróleo em solo contaminado, transformando os contaminantes em subprodutos menos nocivos ao meio ambiente.

Constituem o objeto de estudo da presente pesquisa sete bactérias extraídas da rizosfera de plantas comprovadamente fitorremediadoras. Destas, quatro foram extraídas da rizosfera de *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc., duas da rizosfera de *Mimosa scabrella* Benth e uma da rizosfera de *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. Objetivou-se, portanto, desenvolver microesferas a partir da imobilização de consórcios das bactérias extraídas da rizosfera das plantas citadas para a degradação de petróleo.

A presente dissertação está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo consiste em uma revisão de literatura sobre a importância da rizosfera para a biorremediação de solos contaminados com petróleo, e foi elaborado conforme as instruções para autores da revista *International Journal of Environmental Science and Technology* (Anexo I). O segundo capítulo é uma revisão sobre a biorremediação de solos contaminados com petróleo a partir da imobilização de consórcios bacterianos, seguindo as normas da revista *Journal of Environmental Management* (Anexo II). O terceiro e o quarto capítulos referem-se aos artigos resultantes da presente pesquisa, propostos segundo as normas estabelecidas pela revista *FEMS Microbiology Letters* (Anexo III).

## CAPÍTULO I

### IMPORTÂNCIA DA RIZOSFERA PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

#### RIZOSFERA E BIORREMEDIAÇÃO

**Suellyn Homan<sup>a,b</sup>, Leila Teresinha Maranhão<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Mestrado em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo (UP), R. Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300, Curitiba, PR CEP: 81.280-330, Brasil.

<sup>b</sup> Autor correspondente. E-mail: su\_homan@hotmail.com

#### RESUMO

Atividades relacionadas ao uso intenso de petróleo e seus derivados podem gerar consequências à biodiversidade e à saúde humana, visto que são comuns acidentes envolvendo derramamentos no solo. Deste modo, surge a necessidade da aplicação de métodos de tratamento para a descontaminação ambiental, por meio de processos que envolvam a degradação ou redução dos contaminantes. Vários métodos físicos, químicos e biológicos podem ser utilizados, por isso o objetivo do presente artigo é identificar os principais métodos de tratamento empregados para a remediação de solos contaminados com petróleo, com destaque para a importância da rizosfera na biorremediação. Para tanto, realizou-se um levantamento de artigos, em que foi possível identificar a utilização, as vantagens e as desvantagens de cada um dos métodos usados para remediação de solos. Dentre estes métodos, a biorremediação destaca-se como uma alternativa de baixo custo, baixo consumo de energia e com alta aceitação pública. Cabe destacar o processo de rizodegradação, em que os micro-organismos, associados à rizosfera de plantas fitorremediadoras, realizam a degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Ao final, ressalta-se a importância da bioprospecção de micro-organismos rizosféricos, autóctones, não patogênicos e resistentes ao contaminante, com potencial para utilização em processos de tratamento de ambientes contaminados com petróleo.

**Palavras-chave:** Contaminação por petróleo; hidrocarbonetos de petróleo; fitotecnologia; fitorremediação; rizodegradação.

## Introdução

O petróleo, composto originado a partir da transformação de grandes deposições fósseis, é constituído principalmente por hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos e pequenas quantidades de asfaltenos e resinas (McGuinness e Dowling 2009; Dindar et al. 2013). Cerca de 10% de sua composição é formada por enxofre, 5% por oxigênio e 1% por nitrogênio (Aleixo et al. 2007; Spiro e Stigliani 2009).

Trata-se de uma das principais fontes energéticas mundiais, sendo a indústria de refino de petróleo uma das maiores no mundo, mantendo-se em contínuo crescimento, o que requer a ampliação de sua produção, transporte, armazenamento e distribuição (Agência Internacional de Energia 2013; Speight 2014).

Frente a esta estruturação logística de produção e comercialização de petróleo, e perante este ambiente de contraste, em que é preciso conciliar sua crescente demanda com a proteção ambiental, surgem preocupações relacionadas ao potencial de contaminação do solo e da água por meio de acidentes, cada vez mais frequentes, envolvendo hidrocarbonetos de petróleo (Pandey et al. 2009; Lotfinasabasl et al. 2013; Bramley-Alves et al. 2014).

Estes hidrocarbonetos podem ser introduzidos no ambiente por meio de derramamentos de óleo, vazamentos acidentais em ductos, embarcações, plataformas de perfuração e produção de óleo e unidades industriais (Aleixo et al. 2007; Gerhardt et al. 2009; McGuinness e Dowling 2009; Das e Chandran 2011). Há, ainda, a eliminação inadequada de resíduos e solventes orgânicos (Guedes et al., 2010) e o descarte incorreto dos produtos derivados do petróleo, que comprometem tanto o solo como as fontes de água (Vaitsman e Vaitsman 2006; Rocha et al. 2010), o que pode impactar negativamente os ecossistemas terrestres e aquáticos (Lotfinasabasl et al. 2013).

Dentre os diversos componentes do petróleo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) formam um grupo de xenobióticos e, devido à sua difícil degradação, são conhecidos por sua alta persistência no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição da flora e fauna a esses compostos (McGuinness e Dowling 2009; Balachandran et al. 2012; Mohanty et al. 2013). Os HPAs são comprovadamente tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, capazes de realizar biomagnificação e bioacumulação nos diversos níveis tróficos das diferentes cadeias alimentares (Guedes et al. 2010; Balachandran et al. 2012; Zafra et al. 2014).

Diante do exposto, há a necessidade da utilização de técnicas que visem a redução ou a degradação de contaminantes presentes no solo (Farias et al. 2009). Vários métodos de tratamento, químicos, físicos ou biológicos, estão sendo utilizados para a minimização destes

impactos (Pandey et al. 2009; Dindar et al. 2013). Entretanto, buscaram-se técnicas viáveis e promissoras, que tenham baixo custo, baixo consumo de energia, que possam ser realizados *in situ*, além de serem altamente eficientes contra xenobióticos e permitirem a regeneração sustentável do solo contaminado (Farias et al. 2009; Wu et al. 2013). Dentro desse contexto, destaca-se o processo de biorremediação, em que são utilizados micro-organismos, nativos ou cultivados, para degradar, transformar ou imobilizar contaminantes em águas subterrâneas e em solos contaminados (Andrade et al. 2010; Weber e Santos 2013).

Este artigo descreve e analisa as principais características dos métodos de tratamento empregados na remediação de solos contaminados com petróleo, porém, com foco para a importância da rizosfera na biorremediação. Para tanto, realizou-se um levantamento de artigos científicos publicados, que envolvem a temática, no período de 1995 a 2015, na base de dados “Web of Science”. Foram consideradas principalmente as informações referentes às vantagens, desvantagens e utilização do método. Ao final, a biorremediação é destacada como uma alternativa de baixo custo, baixo consumo de energia e com melhor aceitação pública, sendo o processo de rizodegradação relevante para a bioprospecção de micro-organismos rizosféricos com potencial para utilização em processos de tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

### **Técnicas de Tratamento**

Nas últimas décadas, várias técnicas de tratamento têm sido propostas para a remediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados. Essas técnicas podem ser separadas em dois processos básicos: tratamento *in situ*, isto é, no próprio local em que ocorreu a contaminação, e tratamento *ex situ*, em que o solo é removido do local para ser descontaminado.

As técnicas de tratamento *ex situ* e *in situ* podem, ainda, ser divididas em químicas e físicas e biológicas (Tabela 1). Entre as técnicas químicas e físicas de tratamento *ex situ*, destacam-se métodos como a extração química, utilizando um solvente individual ou uma mistura de diferentes solventes, que agem na separação das partículas maiores contaminadas do solo não contaminado (Gan et al. 2009; Liu et al. 2012; Mohanty et al. 2013). Ainda, pela ação de solventes, os contaminantes podem ser dissociados do solo, dissolvidos ou suspensos (Amro 2004a).

Destaca-se, também, a lavagem do solo contaminado, que consiste na escavação e remoção do solo para a remediação (Hans-Holgar e Alexander 2000; Juck et al. 2000), utilizando solventes e processos físicos (Khan et al. 2004; Frutos et al. 2012). Por meio desta

técnica, o solo fino (argila e silte) é separado do solo grosso (areia e cascalho), sendo o último recuperado (Khan et al. 2004; Frutos et al. 2012). E há a incineração, em que o solo pode ser queimado em centrais de incineração, a temperaturas que variam de 870 a 1200 °C, com o objetivo de tornar determinado resíduo menos volumoso, menos tóxico ou atóxico, ou ainda, eliminá-lo (Amro 2004b; Gan et al. 2009).

Nos métodos de tratamento biológicos *ex situ* destaca-se o processo “Landfarming”, técnica antiga e muito utilizada, que consiste na disposição de resíduos na superfície do solo, de forma que a microbiota autóctone atue na biodegradação de hidrocarbonetos (Nakatani et al. 2008). O crescimento desses micro-organismos é estimulado por meio de aeração e/ou adição de nutrientes, minerais e água (Khan et al. 2004). Outro exemplo de técnica de tratamento biológico envolve o uso de biorreatores, utilizados com o intuito de manter as condições ótimas durante o processo, possibilitando o aumento das taxas de degradação dos resíduos contendo hidrocarbonetos (Sá 2002).

Já em relação aos métodos químicos e físicos *in situ*, há a oxidação química, que consiste na injeção local de produtos químicos reativos, com a finalidade de degradar os contaminantes por meio de reações químicas, promovendo a oxidação ou redução das espécies químicas locais (Andrade et al. 2010). Diferentes tipos de oxidantes têm sido investigados e testados para serem utilizados para reparar os solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, por exemplo, o Fenton (Gan et al. 2009).

Outro método que pode ser utilizado é o sistema “Air Sparging”, que consiste na ventilação do solo, por meio da injeção controlada de ar atmosférico, sob pressão, utilizada para mobilizar os compostos voláteis, podendo ser aplicada para extração dos contaminantes presentes no ambiente (Amro 2004b; Khan et al. 2004; Andrade et al. 2010). Os vapores resultantes são tratados antes de serem liberados para a atmosfera (USEPA 1995). Em relação à dessorção térmica, processo que envolve a separação física de contaminantes (Falciglia et al. 2011), o solo contaminado é escavado e aquecido a uma temperatura de 100 a 600 °C, por meio de vapores de alta temperatura e ar comprimido que são injetados no solo, a fim de evaporar contaminantes voláteis com pontos de ebulição nesta gama (USEPA 1995; Terratherm 2003; Amro 2004a; Khan et al. 2004; Gan et al. 2009; Cappuyns 2013).

Já em relação aos métodos de tratamento biológico, por exemplo, a atenuação natural, que consiste na remediação passiva do solo (Andrade et al. 2010), são utilizados processos naturais e micro-organismos nativos, ou seja, que ocorrem naturalmente no local contaminado, para conter a propagação e reduzir a concentração dos contaminantes (Khan et al. 2004;



Meyer et al. 2014). Porém, a atenuação natural é mais lenta que qualquer outro método de tratamento de petróleo (Frick et al. 1999; Khan et al. 2004).

Na maioria dos casos, o tratamento de solos contaminados por HPAs, por meio das técnicas convencionais, torna-se um processo inviável, devido ao seu alto custo e por ser, eventualmente, delongado ou ineficiente (Rock 2003). Deste modo, tem aumentado o interesse pelo desenvolvimento de técnicas remediadoras alternativas, eficientes no processo de limpeza de ambientes contaminados com petróleo e de baixo custo em relação a outras técnicas, dentre as quais, processos biológicos *in situ*, como a fito e a biorremediação vêm se destacando (Shirdam et al. 2008; Farias et al. 2009), principalmente pelo fato de serem economicamente viáveis e de não produzirem subprodutos tóxicos (Atagana 2011).

A fitorremediação é caracterizada pela utilização de vegetais para extrair, degradar, conter ou imobilizar contaminantes, sendo utilizada para a recuperação de solos contaminados com petróleo devido à capacidade das plantas tolerarem os contaminantes na rizosfera (EPA 2006; Landmeyer et al. 2011; Sabir et al. 2015). A estratégia utilizada é a rizodegradação, técnica com maior potencial para remediação de petróleo no solo (EPA 2006; Ma et al. 2009), em que a planta favorece o crescimento de micro-organismos em sua rizosfera - zona do solo influenciada pelas raízes das plantas (EPA 2006) - por meio da disponibilização de oxigênio e compostos orgânicos, os quais, por sua vez, degradam os poluentes, processo este chamado de biorremediação (Gerhardt et al. 2009; Ali et al. 2013; Prashar et al. 2014).

Na Tabela 1 foram compilados os principais aspectos das técnicas de tratamento para a remediação de solos contaminados com petróleo, relatados na base de dados “Web of Science” no período de 1995 a 2015.

**Tabela 1** Principais aspectos de técnicas de tratamento para a remediação de solos contaminados com petróleo relatados na base de dados “Web of Science” no período de 1995 a 2015. COV - Compostos Orgânicos Voláteis

	Métodos	Técnica	Descrição	Vantagem	Desvantagem
Tratamentos <i>ex situ</i>		Extração por solventes	Solventes agem na separação das partículas maiores contaminadas do solo não contaminado.	Descontaminação rápida (Amro 2004a; Wu et al. 2011; Wu et al. 2013). Aplicação em vários tipos de solo (Amro 2004a) e em larga escala (Liu et al. 2015).	Altos custo e consumo de energia (Wu et al. 2011; Liu et al. 2015). Pode gerar perturbação local (Gerhardt et al. 2009; Liu et al. 2012) e risco de contaminação secundária (Wu et al. 2011).
	Físicos e químicos	Lavagem do solo contaminado	Escavação e remoção do solo para remediação, utilizando apenas água, ou água combinada com solventes.	Eficiente para a limpeza de solos contaminados (Huguenot et al. 2015). É rentável, redução dos materiais utilizados (Khan et al. 2004; Frutos et al. 2012).	Transferência dos contaminantes, sem sua destruição (EPA 2006). Gera resíduos que necessitam de tratamento (Frutos et al. 2012; Huguenot et al. 2015). Causa danos ambientais diversos (Cappuyns 2013).
		Incineração	Solo é queimado a fim de tornar os resíduos menos tóxicos, volumosos ou eliminá-los.	Eficiente na redução do volume do resíduo (Andrade et al. 2010). Utilizado para queima de gases do petróleo (Hou et al. 2011).	Alto custo. É inviável para grandes volumes (Andrade et al. 2010).
		“Landfarming”	Disposição de resíduos na superfície do solo, com ação da microbiota na biodegradação.	Ótimo custo-benefício; eficaz para compostos leves do petróleo (Hamdi et al. 2007).	Pode gerar contaminação de lençol freático e emissão de COV (Mphekgo e Cloete 2004). Não é eficiente para compostos pesados (Khan et al. 2004).
	Biológicos	Biorreatores	Mantêm as condições ótimas durante o processo, aumentando a degradação.	Monitoramento contínuo. Tempo reduzido de remediação (Gogoi et al. 2003; Ward et al. 2003).	Alto custo, devido a gastos adicionais (Alexander 1999).

**Tabela 1** (Continuação)

	Métodos	Técnica	Descrição	Vantagem	Desvantagem
Tratamentos <i>in situ</i>		Oxidação química	Injeção local de produtos químicos reativos, a fim de degradar os contaminantes.	Processo rápido (Yap et al. 2010). Eficiente em áreas pequenas (Andrade et al. 2010; Liu et al. 2012).	Alto custo. Não é eficiente em grandes áreas (Andrade et al. 2010). Depende do oxidante utilizado (EPA 2006). Funciona como uma etapa de pré-tratamento, necessitando do uso de outras técnicas posteriormente (Andrade et al. 2010)
	Físicos e químicos	“Air Sparging”	Ventilação do solo, por meio de injeções controladas de ar, para mobilizar os compostos voláteis.	Método rentável (Khan et al. 2004). Eficaz quando aplicado às frações leves do petróleo (USEPA 2001; Khan et al. 2004) e em solos permeáveis (USEPA 1995).	Não é eficaz para hidrocarbonetos pesados (Khan et al. 2004) e nem em solos com baixa permeabilidade (Andrade et al. 2010).
		Dessorção térmica	Injeção de vapores de alta temperatura e ar comprimido, a fim de evaporar contaminantes voláteis.	Ampla aplicabilidade no tratamento de solos contaminados (Harmon et al. 2001). Funciona na maioria dos solos (USEPA 1995).	Processo lento, a eficiência depende das condições do solo (Harmon et al. 2001; Khan et al. 2004; Falciglia et al. 2011). Destruição do solo devido à temperatura (Terratherm 2003; Amro 2004a). Contaminantes vaporizados necessitam de tratamento (Khan et al. 2004).

**Tabela 1** (Continuação)

Métodos	Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens	
Tratamentos <i>in situ</i>			Sem adição de nutrientes, ocorre a remediação de solos com pouca ou nenhuma perturbação (Khan et al. 2004; Andrade et al. 2010).	É mais lenta que qualquer outro método (Frick et al. 1999; Khan et al. 2004). Requer um programa de monitoramento a longo prazo (Khan et al. 2004).	
	Biológicos	Biorremediação	Utilização do potencial metabólico de organismos, como plantas, bactérias, fungos e leveduras para remediação e recuperação ambiental.	Baixo custo, baixo consumo de energia, pouca mudança nas características do ambiente (Pandey et al. 2009; Megharaj et al. 2011). Apresenta uma abordagem sustentável para a recuperação de locais contaminados (Megharaj et al. 2011).	-
		Fitorremediação	Utilização de vegetais, capazes de tolerar contaminantes na rizosfera, para o tratamento de solos contaminados.	Baixo custo e alta eficiência na degradação. Não produz subprodutos tóxicos (EPA 2006; Farias et al. 2009; Atagana 2011).	Pode levar mais tempo que outras técnicas, pois depende do crescimento das plantas (EPA 2006). Contaminantes devem estar em contato com a zona da raiz para ser eficaz (EPA 2006).

“-” Não foram encontrados relatos de desvantagens no período analisado para esta técnica.

Para o período de 1995 a 2015 foram encontrados, na base de dados “Web of Science, 30 artigos que relatam especificamente sobre as diferentes técnicas utilizadas para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo. Pela análise dos trabalhos, conforme exposto na Tabela 1, constatou-se que a escolha da técnica de tratamento depende principalmente das características do local contaminado, custos e limitações de tempo.

A seguir serão relatadas as principais vantagens e desvantagens das técnicas de tratamento *ex situ* e *in situ*. Em relação à extração química, as principais vantagens são o curto período para a descontaminação do local e a aplicação para vários tipos de poluentes e solos contaminados, sendo mais eficiente, entretanto, em solos com baixo teor de argila (Amro 2004b). As suas principais desvantagens estão relacionadas aos custos e à possibilidade de alterarem as características físicas, químicas e biológicas do solo tratado (Gerhardt et al. 2009; Liu et al. 2012), o que pode causar distúrbios de grande proporção no local. Por exemplo, a lavagem de solo contaminado gera grande perturbação local, visto que apenas promove a transferência dos contaminantes de um local para outro, sem que haja a degradação e/ou redução dos mesmos (Gerhardt et al. 2009; Liu et al. 2012). O emprego dessa técnica gera resíduos secundários, que necessitam de tratamento por meio de outras técnicas (Frutos et al. 2012; Huguenot et al. 2015). Associam-se ainda ao uso de métodos químicos e físicos de tratamento alguns impactos ambientais negativos, como emissões de compostos voláteis, odor incômodo, além de ruído e de gastos com escavadeiras e equipamentos de transporte (Cappuyns 2013), o que torna, na maioria das vezes, o processo inviável e oneroso.

Já com relação à incineração, sua principal vantagem se relaciona à eficiência, uma vez que reduz o volume de resíduo a ser disposto, além de poder ser utilizada para queima de gases provenientes do petróleo (Andrade et al. 2010; Hou et al. 2011). Porém, sua principal desvantagem se refere à inviabilidade do processo, pois depende do volume de solo a ser tratado e apresenta os maiores custos relacionados ao tratamento de solos contaminados com petróleo (Khan et al. 2004; Andrade et al. 2010).

A técnica “Landfarming” apresenta ótimo custo-benefício quando comparada aos demais processos de tratamento de resíduos sólidos, além disso é mais eficaz na volatilização dos constituintes mais leves do petróleo (Hamdi et al. 2007). Os hidrocarbonetos mais pesados, porém, requerem tempo maior para a biodegradação (USEPA 2001). Este método pode gerar problemas de emissão atmosférica de compostos orgânicos voláteis e contaminação do lençol freático (Mphekgo e Cloete 2004). Por fim, a utilização de biorreatores é uma alternativa destacável do ponto de vista de eficiência. O emprego desta técnica permite o monitoramento contínuo do desempenho do sistema, o controle das condições e tempo reduzido de

remediação (Gogoi et al. 2003; Ward et al. 2003). Associam-se negativamente ao uso de biorreatores os custos, que são superiores quando comparados aos demais tratamentos *in situ*, pois há gastos adicionais com o transporte do material contaminado, construção de equipamentos, mão-de-obra e energia (Alexander 1999).

Já a oxidação química, em áreas altamente contaminadas, pode ser utilizada como um pré-tratamento, que gerará melhores condições para o emprego de outras técnicas. Trata-se de um método eficiente em áreas pequenas, mas apresenta custo elevado (Andrade et al. 2010; Liu et al. 2012) e necessita de seu uso associado a outras técnicas, o que torna o processo oneroso. O sistema “Air Sparging” é uma tecnologia eficaz quando aplicada às frações mais leves do petróleo, como a gasolina (USEPA 2001). No entanto, normalmente não é eficaz em solos com baixa permeabilidade, como os siltosos e argilosos (Andrade et al. 2010), por isso não pode ser amplamente utilizado. Em relação à dessorção térmica, há uma ampla aplicabilidade (Harmon et al. 2001), mas o inconveniente deste processo relaciona-se ao uso de temperaturas extremamente elevadas para aquecimento do solo, que destroem os contaminantes, mas também destroem o solo (Terratherm 2003; Amro 2004a), e principalmente a biota. Além disso, não é igualmente eficaz em todos os tipos de solos, visto que a presença de água reduz sua eficiência (Khan et al. 2004). E pelo fato dos hidrocarbonetos de petróleo serem compostos hidrofóbicos, eles tendem a adsorver a matéria orgânica do solo, o que torna a dessorção térmica menos efetiva (Yap et al. 2010).

Em relação à atenuação natural, sua principal vantagem é que, mesmo sem o acréscimo de nutrientes no solo ou adequação de qualquer condição ambiental, a redução do contaminante pode acontecer de maneira eficiente e contínua (Andrade et al. 2010). Compreende uma técnica mais simples e mais lenta que qualquer outro método de tratamento de solo contaminado por petróleo (Frick et al. 1999; Khan et al. 2004). Por isso pode ocorrer, se não for controlada, a migração da pluma de contaminação para outros locais (Khan et al. 2004). Os principais critérios para a sua aplicação se baseiam em evidências de que o processo ocorre no local naturalmente. E também, é imprescindível que, após a sua aplicação, seja implementado um programa de monitoramento em longo prazo (Khan et al. 2004).

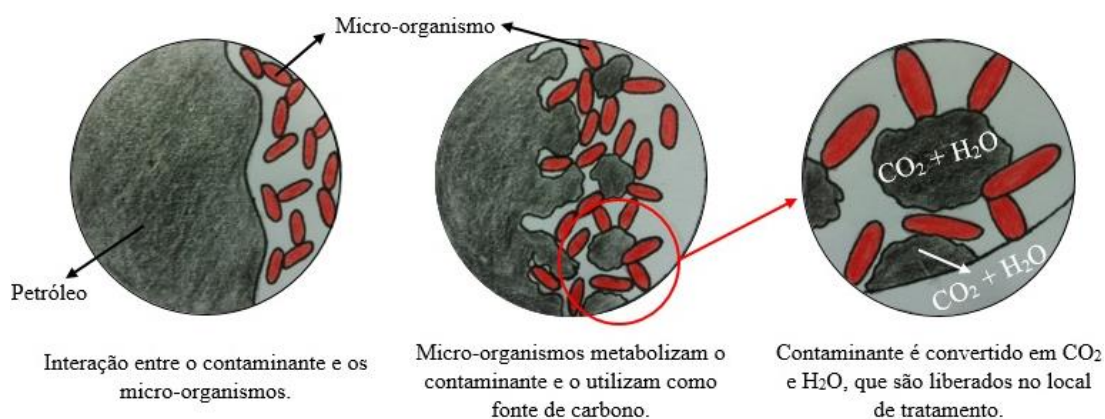
A biorremediação possui inúmeras vantagens quando comparada à maioria dos métodos físicos e químicos. As que merecem destaque são: o baixo custo, o baixo consumo de energia, a alta eficiência e a ausência de tratamento secundário (Pandey et al. 2009; Yap et al. 2010; Liu et al. 2014; Adams et al. 2015). Somam-se ainda às vantagens da biorremediação a sua sustentabilidade, pois é uma técnica que congrega aspectos econômicos, já destacados anteriormente; aspectos ecológicos, ou seja, que se integra ao ambiente em

recuperação; e aspectos sociais, uma vez que é bem aceita socialmente. Desta forma, é uma das técnicas mais promissoras para o tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, sendo seus aspectos principais aprofundados na sequência deste artigo.

## Biorremediação

A biorremediação começou a ser empregada em 1988, quando cientistas utilizaram micro-organismos para tratar solo contra poluentes e lixos tóxicos (Tortora et al. 2005). Trata-se de uma técnica utilizada com o intuito de reduzir os efeitos tóxicos de poluentes presentes no ambiente, por meio do uso do potencial metabólico de organismos, como plantas, bactérias e fungos (Pandey et al. 2009; Singh et al. 2014; Adams et al. 2015). Além da utilização de processos que objetivam acelerar a degradação e/ou conversão dos contaminantes em compostos com baixa ou nenhuma toxicidade e que sejam menos prejudiciais ao ecossistema (Andrade et al. 2010; Pontes et al. 2013). Também é usada em escala comercial para o tratamento de diversos resíduos e para a recuperação ou remediação de áreas contaminadas, demonstrando-se como uma técnica emergente para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (Perelo et al. 2010; Wang et al. 2011).

De modo geral, baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos nativos ou adicionados no local de contaminação (Andrade et al. 2010; Meyer et al. 2014). Estes podem degradar uma ampla variedade de contaminantes orgânicos e se adaptar a diferentes ambientes, contribuindo com a biorremediação (Herrero e Stuckey 2015). No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, na Fig. 1, é apresentada, de forma simplificada, a ação dos micro-organismos no processo de biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados.



**Fig. 1.** Esquema simplificado da ação dos micro-organismos no processo de biorremediação de ambiente contaminado com petróleo.

Os micro-organismos metabolizam os hidrocarbonetos de petróleo e os utilizam como fonte de carbono para seu crescimento, tendo como produtos finais, principalmente, água e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (McCutcheon e Schonoor 2003; Kuiper et al. 2004). Essa constitui umas das vantagens da biorremediação, porque os subprodutos formados não são prejudiciais ao meio ambiente, por isso, não há necessidade de tratamento posterior.

Além dessa vantagem, destacam-se a possibilidade de aplicação no ambiente em que ocorreu a contaminação, sem a necessidade de remoção e transporte de solo contaminado (Andrade et al. 2010; Meyer et al. 2014). Também, apresenta menores riscos à saúde humana e gera poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do ambiente, quando comparada às tecnologias convencionalmente utilizadas (McGuinness e Dowling 2009; Pandey et al. 2009; Tonini et al. 2010).

Perante essas vantagens, a biorremediação passou a ser amplamente empregada para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo. Liu et al. (2014), utilizando a estirpe *Acinetobacter* sp. em testes de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, constataram que esta pode usar o óleo bruto como fonte de carbono, apresentando uma degradação de 70,3% em sete dias. Hassanshahian et al. (2014) isolaram 15 bactérias de ambiente contaminado com petróleo, destas, uma cepa (*Corynebacterium variabile*) foi selecionada e apresentou eficiência de degradação de petróleo bruto de 82% em sete dias de incubação. Al-Wasify e Hamed (2014) testaram a eficiência de degradação de três bactérias isoladas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter lwoffii*) após 28 dias de incubação. Neste estudo verificaram a degradação de 77,8% por *Pseudomonas aeruginosa*, 76,7% por *Bacillus subtilis* e 74,3% por *Acinetobacter lwoffii*.

Diante do potencial de utilização dos micro-organismos na biorremediação para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, há a necessidade de selecionar e bioprospectar outras espécies de bactérias, fungos e leveduras, indígenas e cultiváveis, de tal forma que se possa ampliar as possibilidades de uso da biorremediação (Alexander 1999). Devem ser priorizados micro-organismos autóctones, não patogênicos e resistentes ao contaminante. A escolha e seleção de micro-organismos que englobem o máximo destas características é essencial para que a técnica seja realmente efetiva.

Esta seleção dos micro-organismos pode ocorrer de duas maneiras. A primeira é a partir do isolamento dos micro-organismos no próprio local contaminado, visto que apresentam grande probabilidade de terem sido pré-selecionados pelas próprias condições ambientais (Wenzel 2009). Outra forma de seleção é o isolamento a partir da rizosfera de plantas comprovadamente fitorremediadoras de petróleo, região do solo adjacente ao sistema de raízes

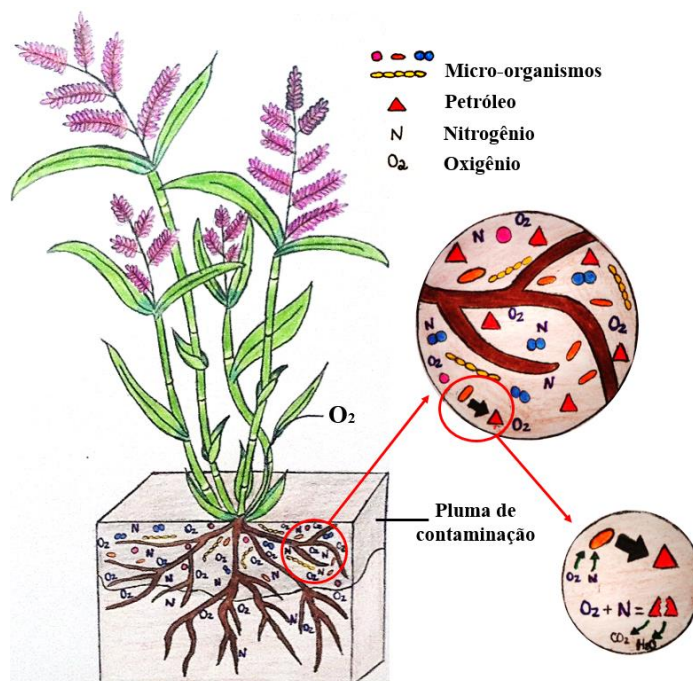


da planta, que suporta alta atividade microbológica (Prashar et al. 2014) e apresenta interação com vários organismos (Li et al. 2014). Esta estratégia de fitorremediação de petróleo é conhecida como rizodegradação, e é altamente promissora para o tratamento de solos contaminados (Ma et al. 2009).

### **Rizodegradação**

A rizodegradação fundamenta-se na utilização de micro-organismos associados à rizosfera das plantas, que realizam a biodegradação dos poluentes orgânicos presentes no ambiente (Wang et al. 2011; Lee et al. 2012). A rizosfera consiste na região ao redor das raízes dos vegetais que apresenta interação com outros organismos, como bactérias, fungos, oomicetos, nematoides, entre outros (Li et al. 2014; Zhang et al. 2015).

Este processo de rizodegradação ocorre devido à interação da planta com os micro-organismos, que é mediada pela liberação de oxigênio, nutrientes, metabólitos e exsudatos na rizosfera vegetal (EPA 2006; Li et al. 2014; Prashar et al. 2014). Esta liberação estimula as atividades microbológicas, resultando na degradação do petróleo, por meio de sua utilização como fonte de carbono (EPA 2006; Gerhardt et al. 2009; Ali et al. 2013; Mendes et al. 2013; Prashar et al. 2014). Além disso, por meio da ação destes micro-organismos, a planta torna-se tolerante ao poluente e pode crescer e se desenvolver em ambientes contaminados com hidrocarbonetos e derivados de petróleo (Kuiper et al. 2004; Li et al. 2014), como pode ser observado na Fig. 2.



**Fig. 2.** Esquema simplificado do processo de rizodegradação, em que a planta favorece o crescimento de micro-organismos em um rizosfera, que degradam o petróleo.

Dentre estes micro-organismos utilizados para a fitorremediação de petróleo, as bactérias e os fungos filamentosos destacam-se pelo fato de apresentarem maior frequência em solos contaminados com petróleo, quando comparados a outros micro-organismos (Pandey et al. 2009; Mendes et al. 2013). Por isso, estes dois grupos são os mais estudados em pesquisas relacionadas à biorremediação e podem contribuir de forma mais efetiva para a remediação e ecoestruturação de locais contaminados com petróleo (Lee et al. 2012; Mendes et al. 2013).

Em relação às bactérias, alguns gêneros destacam-se na literatura como degradadores de petróleo, como por exemplo, *Alcanivorax*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Erythrobacter*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Stenotrophomonas* (Chaillan et al. 2004; Jacques et al. 2010; Hassanshahian et al. 2013; Al-Wasif e Hamed 2014; Hassanshahian et al. 2014; Zafra et al. 2014; Gao et al. 2015).

Já em relação aos fungos, os gêneros que mais se destacam são *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Graphium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Chaillan et al. 2004; Atagana et al. 2006; Jacques et al. 2010; Zafra et al. 2014).

Diante desta ampla utilização de micro-organismos para o tratamento de ambientes contaminados, a bioprospecção daqueles selecionados naturalmente em áreas contaminadas

com hidrocarbonetos de petróleo representa uma importante estratégia de inovação tecnológica, com a finalidade de obter os agentes degradadores do próprio local ou da rizosfera de plantas fitorremediadoras, otimizando, desta forma, os processos de biorremediação.

## **Conclusão**

A biorremediação destaca-se como um método promissor para a remediação de solos contaminados com petróleo, porque apresenta diversas vantagens quando comparada às demais técnicas de tratamento. No processo de biorremediação, pode-se constatar que a rizosfera possui um papel ecológico muito importante, visto que propicia o desenvolvimento de micro-organismos, sobretudo bactérias e fungos filamentosos, por meio da liberação de oxigênio e exsudatos, e esses realizam a degradação dos contaminantes presentes no ambiente. Cabe ressaltar o potencial da bioprospecção de novos micro-organismos, principalmente extraídos do próprio local contaminado ou da rizosfera de plantas fitorremediadoras que possam contribuir de maneira efetiva para a descontaminação ambiental.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo (UP), por sua assistência para a realização do presente trabalho e pelo apoio ao estudo.

## **Referências**

Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I (2015) Biorremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Inter J Environ Bioremed Biodegrad* 3:28–39

Agência Internacional de Energia (2013) Key word energy statistics

Aleixo LAG, Tachibana T, Casagrande D (2007) Poluição por petróleo - formas de introdução de petróleo e derivados no ambiente. *Integração* 13:159–166

Alexander M (1999) *Biodegradation and bioremediation*, 2ª ed. Academic Press, USA

Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications, *Chemosphere* 91:869–881

Al-Wasify R, Hamed SR (2014) Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *Inter J Bac* 2014:1–8

Amro MM (2004a) Treatment techniques of oil-contaminated soil and water aquifers. *International Conference on Water Resources & Arid Environment* 2004

Amro MM (2004b) Factors affecting chemical remediation of oil contaminated water-wetted soil. *Chem Eng Technol* 27:890–894

Andrade JA, Augusto F, Jardim ICSF (2010) Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclet Quim* 35:17–43

Atagana HI (2011) Bioremediation of co-contamination of crude oil and heavy metals in soil by phytoremediation using *Chromolaena odorata* (L) King & H.E. Robinson. *Water Air Soil Pollut* 215:261–271

Atagana HI, Haynes RJ, Wallis FM (2006) Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi, *Water Air Soil Pollut* 172: 201–219

Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S (2012) Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil-contaminated soil. *Bioresour Technol* 112:83–90

Bramley-Alves J, Wasley J, King CK, Powell S, Robinson SA (2014) Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: An effective management option. *J Environ Manage* 142:60–69

Cappuyns V (2013) Environmental impacts of soil remediation activities: quantitative and qualitative tools applied on three case studies. *J Clean Prod* 52:145–154

Chaillan F, Lefleche A, Bury E, Grimont P, Saliot A, Oudot J (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 155:587–595

Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol Res Int* 2011:1–13

Dindar E, Sagban FOT, Baskaya HS (2013) Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil. *J Environ Biol Science* 19:39–47

EPA: Environmental Protection Agency (2006) *Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons* 1–171

Falciglia PP, Giustra MG, Vagliasindi FGA(2011) Low-temperature thermal desorption of diesel-polluted soil: Influence of temperature and soil texture on contaminant removal kinetics. *J Hazard Mater* 185:392–400

Farias V, Maranhão LT, Vasconcelos EC, Carvalho Filho MAS, Lacerda LG, Menegassi JAA, Pandey A, Socol CR (2009) Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Appl Biochem Biotechnol* 157:10–22

Frick CM, Farrel RE, Germida JJ (1999) Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. University of Saskatchewan (Department of Soil Science), Canadá

Frutos FJ, Pérez R, Escolano O, Rubio A, Gimeno A, Fernandez MD, Carbonell G, Perucha C, Laguna J (2012) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: Evaluation of bioremediation technologies. *J Hazard Mater* 199–200:262–271

Gan S, Lau EV, Ng HK (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* 172:532–549

Gao X, Gao W, Cui Z, Han B., Yang P, Sun C, Zheng L (2015) Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Mar Pollut Bull* 97:373–380

Gerhardt KE, Huang X, Glick BR, Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci* 176:20–23

Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P, Krishna Mohan TR (2003) A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Adv Environ Res* 7:767–782

Guedes CLP, Correr CJ, Lobo I, Abi-Saab OJG (2010) Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. *Semina: Tech. Ex.* 31:87–100

Hamdi H, Benzarti S, Manusadzianas L, Aoyama I, Jedidi N (2007) Bioaugmentation and Bioestimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol Biochem* 39:1926–1935

Hans-Holgar L, Alexander M (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40:7–10

Harmon TC, Burks GA, Aycaguer AC, Jackson J (2001) Thermally enhanced vapour extraction for removing PAHs from lampblack-contaminated soil. *J Environ Eng* 127:986–993

Hassanshahian M, Ahmadinejad M, Tebyanian H, Kariminik A (2013) Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Mar Pollut Bull* 73:300–305

Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH (2014) Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Mar Pollut Bull* 82:39–44

Herrero M, Stuckey DC (2015) Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 140:119–128

- Hou SS, Ko YC, Lin TH (2011) Study on incineration technology of oil gas generated during the recovery process of oil spill. *Energ Convers Manage* 52:1662–1668
- Huguenot D, Mousset E, Van Hullebusch ED, Oturan MA (2015) Combination of surfactant enhanced soil washing and electro-Fenton process for the treatment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons. *J Environ Manage* 153:40–47
- Jacques RJS, Silva KJ, Bento FM, Camargo FAO (2010) Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Cienc Rural* 40:310–317
- Juck D, Charles T, Whyte LG, Greer CW (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol* 33:241–249
- Khan FI, Husain T, Hejari R (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *J Environ Manage* 71:95–122
- Kuiper I, Legendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2004) Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe In* 17:6–15
- Landmeyer JE (2011) Introduction to phytoremediation of contaminated groundwater: Historical foundation, hydrologic control, and contaminant remediation. New York, Springer
- Lee S, Ka JO, Gyu SH (2012) Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. *J Microbiol* 50:45–49
- Liu B, Li X, Li Z, Sui H, Li H (2015) Fluidized countercurrent solvent extraction of oil pollutants from contaminated soil. Part 1: Fluid mechanics. *Chem Eng Res Des* 94:501–507
- Liu H, Yao J, Yuan Z, Shang Y, Chen H, Wang F, Masakorala K, Yu C, Cai M, Blake RE, Choi MMF (2014) Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. *Inter Biodeterior Biodegradation* 87:52–59
- Liu R, Jadeja RN, Zhou Q, Liu Z (2012) Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. *Environ Eng Sci* 29:494–501
- Li X, Rui J, Mao Y, Yannarell A, Mackie R (2014) Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biol Biochem* 68:392–401
- Lotfinasabasl S, Gunale VR, Rajurkar NS (2013) Petroleum Hydrocarbons Pollution in Soil and its Bioaccumulation in mangrove species, *Avicennia marina* from Alibug Mangrove Ecosystem, Maharashtra, India. *Int J Advanc Res Technol* 2:1–7
- Ma B, He Y, Chen HH, Xu JM (2009) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through metaanalysis. *Environ Pollut* 159:855–861
- McCutcheon SC, Schonoor JL (2003) Phytoremediation: transformation and control of contaminants. John Wiley & Sons, New Jersey

- McGuinness M, Dowling D (2009) Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *Int J Environ Res Public Health* 6:2226–2247
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms, *FEMS Microbiol Rev* 37:634–663
- Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int* 37:1362–1375
- Meyer DD, Beker SA, Bücken F, Peralba MCR, Frazzon APG, Osti JF, Andreatza F, Camargo FAO, Bento FM (2014) Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *Int Biodeterior Biodegradation* 95:356–363
- Mohanty S, Jasmine J, Mukherji S (2013) Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. *BioMed Res Int* 2013:1–16
- Mphekgo PM, Cloete TE (2004) Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Environ Scienc Bio/Technol* 3:349–360
- Nakatani AS, Siqueira JO, Soares CRFS, Lambais MR (2008) Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "Landfarming" de resíduos petroquímicos. *Rev Bras Cienc Solo* 32:1501–1512
- Pandey J, Chauhan A, Jain RK (2009) Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. *FEMS Microbiol Rev* 33:324–375
- Perelo LW (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 177:81–89
- J. Pontes J, Mucha AP, Santos H, Reis I, Bordalo A, Basto MC, Bernabeu A, Almeida CMR (2013) Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Mar Pollut Bull* 76: 258–265
- Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 13:63–77
- Rocha JC, Rosa AH, Cardoso AA (2010) *Introdução à Química Ambiental*, 2nd edn. Brookman, Porto Alegre
- Rock SA (2003) Field Evaluations of Phytotechnologies. In: Mccutcheon SC, Schnoor JL (2003) *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. John Wiley & Sons, New Jersey
- Sabir M, Waraich EA, Hakeem KR, Ozturk M, Ahmad HS, Shahid M (2015) *Phytoremediation: Mechanisms and Adaptations*. *Soil Remediation and plants* 1:85–105

- Shirdam R, Zand AD, Bidhendi GN, Mehrdadi N (2008) Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plants species. *Phytoprotection* 89:21–29
- Singh R, Singh P, Sharma R (2014) Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 4:1–6
- Speight JG (2014) *The Chemistry and Technology of Petroleum*
- Spiro TG, Stigliani WM (2009) *Química Ambiental*. Pearson Prentice Hall, São Paulo
- Terratherm A (2003) Demonstration of In Situ Thermal Desorption Thermal Blankets and Wells. TerraTherm Environmental Services, Inc., pp 01–04
- Tonini RMCW, Rezende CE, Grativol AD (2010) Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis* 14:1025–1035
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2005) *Microbiologia*, 8th edn. Editora Artmed, Porto Alegre
- USEPA - United State Environmental Protection Agency (2001) *Technology Innovation Office. Treatment technologies screening matrix and reference guide* US Environmental Protection Agency, Washington
- USEPA - United State Environmental Protection Agency (1995) *How to Evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites*. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency, Washington
- Vaitsman EP, Vaitsman DS (2006) *Química e Meio Ambiente: Ensino Contextualizado*. Interciência, Rio de Janeiro
- Wang Z, Xu Y, Zhao J, Li F, Gao D, Xing B (2011) Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *J Hazard Mater* 190:677–685
- Ward O, Singh A, Van Hamme J (2003) Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *J Ind Microbiol Biot* 30:260–270
- Weber BD, Santos AA (2013) Utilização de biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. *EA* 10:114–133
- Wenzel WW (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321:385–408
- Wu G, Coulon F, Yang Y, Li H, Sui H (2013) Combining solvent extraction and bioremediation for removing weathered petroleum from contaminated soil. *Pedosphere* 23:455–463
- Wu G, Li X, Coulon F, Li H, Lian J, Sui H (2011) Recycling of solvent used in a solvent extraction of petroleum hydrocarbons contaminated soil. *J Hazard Mater* 186:533–539
- Yap CL, Gan S, Ng HK (2010) Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. *J Hazard Mater* 177:28–41



Zafra G, Absalón AE, Cuevas MD, Cortés-Espinosa DV (2014) Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut* 225:1826–1844

Zhang Y, Liu ZL, Song M (2015) ChiNet uncovers rewired transcription subnetworks in tolerant yeast for advanced biofuels conversion. *Nucleic Acids Res* 43:4393–4407

## CAPÍTULO II

Biorremediação de solos contaminados com petróleo a partir da imobilização de consórcios de micro-organismos

**Suellyn Homan<sup>a,\*</sup>, Leila Teresinha Maranhão<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo, Rua Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300, CEP 81.280-330, Curitiba, PR, Brasil.

\* Autor para correspondência.

E-mail: su\_homan@hotmail.com (S. Homan), maranhão@up.edu.br (L. Maranhão).

### DESTAQUES

- Consórcios de micro-organismos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo.
- Micro-organismos com capacidade de crescimento em substratos com petróleo, como única fonte de carbono.
- Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo a partir da imobilização de consórcios de micro-organismos.
- Imobilização como alternativa para preservação e armazenamento microbiano.

### RESUMO

Devido à intensa exploração de petróleo, são frequentes os acidentes em que este é derramado e pode persistir por longos períodos no local, causando danos ao ecossistema. Deste modo, são necessários a utilização e o desenvolvimento de técnicas efetivas para a remediação de ambientes contaminados com petróleo. A biorremediação destaca-se por ser uma técnica eficiente e de baixo custo, em que utilizam-se micro-organismos associados à rizosfera das plantas para a remoção ou redução da concentração dos contaminantes. Para otimizar esta técnica, podem ser estabelecidos consórcios de micro-organismos degradadores de petróleo, que podem ser imobilizados em suportes baseados em polímeros naturais, a fim de que sejam preservadas suas características. Neste contexto, objetiva-se demonstrar a importância da utilização de consórcios e sua imobilização como forma de otimização da biorremediação. A utilização de consórcios microbianos, por meio da cooperação sinérgica entre os micro-organismos, permite a mineralização completa dos compostos de petróleo e a imobilização destes consórcios, em matrizes poliméricas, auxilia na proteção e preservação

microbiana. Cabe destacar a necessidade de novas pesquisas para o estabelecimento de consórcios, que possam ser imobilizados e utilizados na remediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados.

**Palavras-chave:** Poluição. Petroderivados. Remediação. Consórcios. Aprisionamento em matrizes.

## 1. Introdução

O petróleo, composto de origem fóssil, é formado por uma mistura de diversos compostos orgânicos, em que predominam os hidrocarbonetos saturados e aromáticos, além de baixas concentrações de asfaltenos, resinas e metais (Dindar et al., 2013; Speight, 2014; Van Hamme et al., 2003). Juntamente com o carvão e o gás natural, trata-se de uma das principais matrizes energéticas mundiais (Agência Internacional de Energia, 2013; Confederação Nacional da Indústria, 2007), pois fornece subprodutos amplamente utilizados, como combustíveis, solventes e lubrificantes (Gaylarde et al., 1999; Speight, 2012).

O rápido crescimento da demanda de petróleo, aliado à instabilidade política nas regiões produtoras, trouxe preocupações relacionadas à oferta de energia (Confederação Nacional da Indústria, 2007; Agência Internacional de Energia, 2013), por isso houve uma ampliação no emprego deste recurso natural, o que acarretou no aumento de sua produção, transporte, armazenamento e distribuição (Banković-Ilić et al., 2012; Crapez et al., 2002).

Devido a este fato, tornaram-se cada vez mais comuns os derramamentos de petróleo, por meio de vazamentos acidentais em instalações, como tanques e tubulações, abandono de sítios de refinaria e eliminação inadequada dos resíduos gerados (Almeda et al., 2014; Chaineau et al., 2003; Liu et al., 2013; Malik et al., 2012; Mei e Yin, 2009; White et al., 2006). Esses fatores acarretam impactos negativos aos ecossistemas (Lotfinasbasl et al., 2013), uma vez que o petróleo sofre alterações em suas características originais (Balachandran et al., 2012; Sloan, 1999) devido à sua lenta biodegradação, podendo permanecer no ambiente por longos períodos (Almeda et al., 2014; Dellagnezze et al., 2014; Maqbool et al., 2012; Michel et al., 2002; Ramos et al., 2009).

A permanência do petróleo no ambiente compromete a conservação da biodiversidade e a saúde humana (McGuinness e Dowling, 2009; Xu et al., 2006; Zafra et al., 2014). A biodiversidade é afetada pela morte de diversos organismos, sejam eles bactérias, fungos, vegetais e animais, e pela interferência indireta nas relações entre os diversos organismos

(Lotfinasabasl et al., 2013). Na saúde humana, o principal problema está relacionado ao potencial carcinogênico e mutagênico do petróleo (Cao et al., 2009; Pothuluri e Cerniglia, 1994; Seo et al., 2009; Zafra et al., 2014).

Como forma de controlar e/ou minimizar esses impactos é importante conhecer os efeitos da contaminação por petróleo no ambiente, porém, para tanto, é importante considerar o tipo de combustível, sua concentração e extensão da contaminação (Kisic et al., 2009; Pezeshki et al., 2000). É importante, ainda, considerar o perfil e a sensibilidade dos locais impactados, assim como o nível de informação e conscientização do público diretamente envolvido, o que permite a avaliação dos danos e o planejamento das ações e auxilia na escolha de um método de tratamento que seja viável para o local (Cantagallo et al., 2007; Gonçalves e Graziera, 2012).

Vários métodos físicos, químicos e biológicos estão sendo desenvolvidos e empregados com o intuito de realizar a limpeza dos solos, seja por meio da redução na concentração e/ou toxicidade dos contaminantes ou pela degradação (Andrade et al., 2010; Dindar et al., 2013; Guedes et al., 2010;). Entre as diversas técnicas utilizadas, a rizodegradação merece destaque, por se tratar de uma técnica que emprega micro-organismos associados à rizosfera das plantas, que promovem a mineralização dos contaminantes, resultando em sua remoção ou redução para um produto menos prejudicial ao ambiente (Dellagnezze et al., 2014; EPA, 2006; Luqueño et al., 2011). Esses micro-organismos, presentes na rizosfera das plantas, podem ser isolados, identificados e utilizados na biorremediação. Essa técnica envolve o uso dos micro-organismos e se destaca como uma das formas mais eficientes de tratamento de ambientes contaminados com petróleo (Ferrera-Cerrato et al., 2006; Merkl et al., 2005).

A principal estratégia utilizada na biorremediação é a inoculação de consórcios de micro-organismos capazes de degradar os contaminantes (bioaugmentação), sendo uma das estratégias mais promissoras dentre as diversas empregadas (Bento et al., 2003; Jacques et al., 2007; Pandey et al., 2009). Podem ser utilizados bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que degradam várias substâncias orgânicas por meio de metabolismos sinérgicos. Esses micro-organismos utilizam o petróleo como fonte de carbono e energia durante o crescimento, o que resulta na redução do petróleo em compostos mais simples (Costa et al., 2007; González et al., 2011; Mandri e Lin, 2007; Mao et al., 2012).

Os consórcios podem ainda ser imobilizados (El Fantroussi e Agathos, 2005; Janbandhu e Fulekar, 2011; Liang et al., 2009; Zhong et al., 2011), permitindo que os micro-organismos estejam protegidos, evitando a competição natural com os micro-organismos

selvagens, além de protegê-los de perturbações, quando as condições ambientais não são favoráveis, como a presença de compostos tóxicos (Wang et al., 2012).

No presente artigo busca-se demonstrar a importância do uso de consórcios microbianos e da imobilização dos mesmos para o tratamento de solos contaminados com petróleo, tendo como foco a otimização da biorremediação. Para tanto, realizou-se um levantamento de artigos científicos publicados envolvendo a temática na base de dados “Web of Science”, no período de 2005 a 2015. Foi realizada também a busca de patentes relacionadas, especificamente, à degradação de petróleo e seus derivados por meio do uso de micro-organismos individuais ou em consórcios.

## **2. Consórcios microbianos e degradação de petróleo**

Uma ampla variedade de micro-organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados em áreas contaminadas (Kumar et al., 2014). Nestas áreas, há micro-organismos pertencentes a diferentes gêneros e espécies que, individualmente, metabolizam quantidades limitadas de hidrocarbonetos. A degradação de hidrocarbonetos mais complexos requer, entretanto, uma cooperação de forma sinérgica entre as várias espécies de micro-organismos (Mao et al., 2012; Mariano et al., 2007; Tian et al., 2008; Ururary et al., 1998;), desta forma, maximizando a eficiência da biodegradação (Janbandhu e Fulekar, 2011; Zhong et al., 2011).

Os consórcios são utilizados para a biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, principalmente devido à complementaridade metabólica entre seus membros (Medina-Moreno et al., 2005; Tian et al., 2008; Tiburtius et al., 2004). Esta complementaridade metabólica é essencial para a degradação de certos hidrocarbonetos, que podem apresentar toxicidade para alguns micro-organismos e, ao mesmo tempo, servir como fonte de carbono e energia para outros (Tonini et al., 2010). Além disso, os micro-organismos capazes de metabolizar os compostos tóxicos geram subprodutos que podem ser utilizados como substrato para o crescimento por outros componentes da microbiota (Moscoso et al., 2012; Tiburtius et al., 2004).

Na inoculação de consórcios de micro-organismos, o processo de biodegradação ocorre na interface petróleo/água, em que os micro-organismos aderem à superfície do petróleo. Como resultado desta aderência e também pela produção de biosurfactantes, que reduzem a tensão superficial e interfacial das gotas de petróleo, a ação dos micro-organismos na degradação de petróleo é facilitada (Brakstad et al., 2002; Pandey et al., 2009).

Biossurfactantes são metabólitos produzidos por vários micro-organismos, e possuem características como emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial, apresentando uma ampla eficiência em variações de temperatura e pH (Colla e Costa, 2003; Tabatabaee et al., 2005), facilitando, desta forma, a biodisponibilidade e a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Lai et al., 2009; Lu et al., 2003).

Pesquisas voltadas ao estudo do uso de consórcios na biodegradação de petróleo são desenvolvidas, uma vez que há a possibilidade de mineralização completa dos seus compostos pela ação de micro-organismos combinados (Jacques et al., 2007; Van Hamme et al., 2003). Na Tabela 1 são apresentadas informações que foram compiladas a partir das principais pesquisas publicadas e encontradas na base de dados “Web of Science” no período de 2005 a 2015. Essas pesquisas descrevem o uso de consórcios de micro-organismos para a degradação de diversos poluentes, sendo descritos os gêneros e/ou espécies de micro-organismos utilizados na combinação dos consórcios, bem como a técnica usada para a remediação e sua aplicação biotecnológica.

**Tabela 1**

Pesquisas sobre uso de consórcios na biodegradação de petróleo e derivados no período de 2005 a 2015, disponíveis na base “Web of Science”.

Micro-organismos utilizados no consórcio	Técnica	Aplicação	Referência
<i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biorremediação	Locais contaminados com petróleo e gerenciamento de derrames de óleo no oceano	Varjani et al., 2015
Consórcio 1: <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Ochrobacterium</i> sp. e <i>Burkholderia multivorans</i> . Consórcio 2: <i>E. aurantiacum</i> , <i>Rhodococcus</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp. Consórcio 3: <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Ochrobacterium</i> sp. e <i>B. multivorans</i>	Biorremediação	Biodegradação de lama oleosa	Jasmine e Mukherji, 2015
<i>Dietzia maris</i> , <i>Bacillus siamensis</i> , <i>Alcanivorax venustensis</i> , <i>Erythrobacter citreus</i> , <i>Marinobacter lipolyticus</i> , <i>Oceanicola nanhaiensis</i> , <i>Erythrobacter flavus</i> , <i>Nitratireductor aquibiodomus</i>	Biorremediação	Biodegradação de petróleo em ambiente de alto mar	Gao et al., 2015
<i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Sphingobium</i> sp., <i>Dokdonella</i> sp., <i>Luteimonas</i> sp.	Biorremediação	Solos contaminados com petróleo	Bacosa e Inoue, 2015
<i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Ruegeria</i> sp., <i>Exiguobacterium</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.	Biorremediação	Ambiente marinho contaminado com óleo	Kumar et al., 2014
<i>Aspergillus nomius</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Rhizomucor variabilis</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptomyces</i> sp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Biorremediação utilizando consórcio de fungos e bactérias	Locais contaminados com petróleo	Zafra et al., 2014

**Tabela 1**

Continuação.

Micro-organismos utilizados no consórcio	Técnica	Aplicação	Referência
<i>Lysinibacillus</i> sp., <i>Brevibacillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Delftia</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp. e <i>Pseudomonas</i> sp.	Biorremediação	Biodegradação de óleo bruto no solo	Roy et al., 2014
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Biorremediação	Biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo	Xu et al., 2013
<i>Gordonia</i> sp., <i>Martellella</i> sp., <i>Cytophaga</i> sp., <i>Sphingopyxis</i> sp., <i>Bhargavaea</i> sp, <i>Mesorhizobium</i> sp. PETBA 09, <i>Mesorhizobium</i> sp. PETBA 10, <i>Mesorhizobium</i> sp. PETBA 13, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Gordonia</i> sp. PETBA 15, <i>Gordonia</i> sp. PETBA 16, <i>Gordonia</i> sp. PETBA 19	Biorremediação utilizando um consórcio bacteriano imobilizado em quitosana	Sedimentos de manguezais contaminados com óleo	Angelim et al., 2013
<i>Ralstonia eutropha</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Fitorremediação e Rizodegradação	Biodegradação de forato em solo	Rani e Juwarkar, 2012
<i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Biorremediação de três HAP (fenantreno, pireno e benzo(a)antraceno)	Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Moscoso et al., 2012
<i>Microbacterium foliorum</i> , <i>Gordonia alkanivorans</i> , <i>Mesorhizobium</i> sp.	Fitorremediação e Rizodegradação	Solo contaminado com petróleo	Maqbool et al., 2012
<i>Pseudomonas koreensis</i> , <i>P. frederiksbergensis</i> , <i>P. putida</i> , <i>Enterobacter ludwigii</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. koreensis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Biorremediação	Solo contaminado com petróleo	González et al., 2011



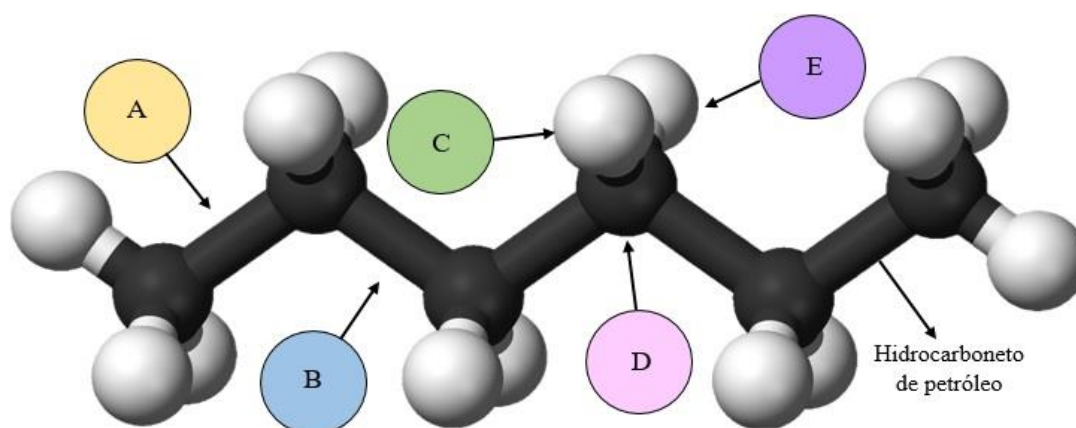
**Tabela 1.**  
Continuação.

Micro-organismos utilizados no consórcio	Técnica	Aplicação	Referência
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Microbacterium</i> sp., <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> , <i>Microbacteriaceae bacterium</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	Biorremediação	Solo contaminado com antraceno	Jacques et al., 2010
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> , <i>Ochrobactrum intermedium</i> , <i>Sphingobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Biorremediação	Biodegradação de misturas de diesel e biodiesel	Owsianiak et al., 2009
<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Delftia acidovorans</i>	Biorremediação	Biodegração de pesticidas em solo e água	Bazot e Lebeau, 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Biorremediação	Solo contaminado com lodo oleoso bruto	Cameotra e Singh, 2008
Três bactérias e uma levedura	Biorremediação	Degradação de compostos tóxicos do lodo de tanque de refinaria de petróleo	Gallego et al., 2007
Consórcio bacteriano formado por bactérias extremófilas, sem citação de gêneros/espécies	Biorremediação	Solos contaminados com fenantreno na Antártica	Ruberto et al., 2006
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Brevibacterium luteum</i> , <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Fitorremediação e Biorremediação	Solo contaminado com petróleo	Medina-Moreno et al., 2005

Para o período de 2005 a 2015 foram encontradas 20 pesquisas científicas que relatam sobre o uso, especificamente, de consórcios de micro-organismos para a degradação de diferentes poluentes ambientais. Destas, cerca de 90% referem-se ao uso de consórcios de micro-organismos para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, aproximadamente 5% referem-se ao uso de consórcios para a biodegradação de pesticidas e cerca de 5% para a biodegradação de inseticidas, o que demonstra a ampla aplicabilidade dos consórcios formados por diferentes micro-organismos.

Da maioria dos artigos relatados para a degradação de hidrocarbonetos, cerca de 55% têm sua aplicação relacionada aos solos contaminados com hidrocarbonetos; cerca de 10% são aplicados para ambientes marinhos; cerca de 10% podem ser aplicados em lodo; cerca de 5% podem ser aplicados tanto para o solo quanto para a água e cerca de 20% não relatam aplicação específica para o ambiente.

As informações contidas na Tabela 1 ressaltam a importância do estabelecimento de consórcios microbianos que degradem diversos compostos, formados por diferentes gêneros e espécies, visto que esses, segundo Jacques et al. (2007), Mao et al. (2012), Medina-Moreno et al. (2005), Mohanty et al. (2013) e Tian et al. (2008), apresentam maior versatilidade metabólica sobre as culturas puras, o que pode otimizar o processo de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Essa complementariedade metabólica entre os micro-organismos que constituem o consórcio, pode ser observada na Fig. 1.



**Fig. 1.** Esquema representativo da cooperação de forma sinérgica dos micro-organismos (A, B, C, D e E) na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Destaque para os micro-organismos capazes de metabolizar compostos tóxicos, gerando subprodutos que podem ser utilizados como substrato para o crescimento de outros micro-organismos, otimizando, desta forma, o processo de biorremediação.

Diante da importância do estabelecimento de consórcios microbianos e do desenvolvimento de produtos que degradem petróleo, com base nestes consórcios, realizou-se ainda a busca de depósitos de patentes mundiais referentes ao uso de consórcios e micro-organismos utilizados de forma isolada, com a finalidade de comparação. Foram encontrados 34 depósitos de patentes. Estas patentes podem ser divididas em quatro grupos, sendo 12 patentes (Tabela 2) referentes aos processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados a partir de um consórcio de micro-organismos (grupo a); 17 patentes (Tabela 3) referentes aos processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados a partir de um micro-organismo específico (grupo b); uma patente referente aos processos de degradação de hidrocarbonetos e petroderivados a partir de micro-organismos nativos (grupo c) e três patentes que não se encaixam nos grupos anteriormente descritos (grupo d).

As patentes pertencentes aos grupos (a) e (b), Tabelas 2 e 3, respectivamente, utilizam micro-organismos de diversos gêneros e espécies, grupo (a), consórcios, e grupo (b), micro-organismos isolados. Nessas patentes, porém, não há distinção de especificidade de uso dos micro-organismos (em nível de espécie), uma vez que um gênero pode conter várias espécies que podem ser utilizadas.

## Tabela 2

Patentes de invenção que utilizam consórcios de micro-organismos para degradação de petróleo seguidas pela relação de gêneros e/ou espécies utilizadas e ano de publicação.

Patente	Micro-organismos	Ano
CN101195810	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pandoraea pnomenusa</i>	2008
CN101560484	<i>Scenedesmus</i> sp., <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Sphingomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pandoraea ponmenusa</i>	2009
CN101735996	<i>Bordetella</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp., <i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp.	2010
CN102876612	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Achromobacter</i> sp.	2013
US20100051541	<i>Rhodococcus</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Oleispira</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Jannaschia</i>	2010
US20140144838	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , formando esporos de bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero <i>Bacillus</i> .	2014

**Tabela 2**  
Continuação.

Patente	Micro-organismos	Ano
WO2007054691	Uso de consórcio, porém sem identificação de gênero ou espécie	2007
WO2010145797	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus, Pseudomonas, Alcanivorax, Cycloclasticus, Marinobacter, Neptunomonas, Oleiphilus, Oleispira</i> e/ou <i>Thalassolitus, Phanerochaete, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Amorphotoeca, Neosartorya, Paecilomyces, Talaromyces</i> e/ou <i>Graphium, Candidais</i>	2010
WO2011153364	<i>Alcanivorax borkumensis, A. dieselolei, A. jadensis, Azoarcus toluvorans, Desulfotomaculum</i> sp., <i>D. aliphaticivorans, Gordonia alkanivorans, Marinobacter hydrocarbonoclasticus, Neptunomonas naphthovorans, Novosphingobium aromaticivorans, Rhodococcus erythropolis, Sphingobium yanoikuyae, Sphingomonas</i> sp., <i>Tranquillimonas alkanivorans, Tropicimonas isoalkanivorans, Thauera aromatica</i> ou <i>Thalassolituus oleivorans</i>	2011
WO2013149662	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Agrobacterium</i> spp., <i>Alcaligenes</i> spp., <i>Aminobacter</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Brevumdimonas</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Cytophagaflavobacterium</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Microbacterium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Nocardioides</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>gamma-Proteobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Nitrosomonas europaea, Phanerochaete chrysosporium</i> e suas combinações. Uma ou mais estirpe(s) selecionada(s) a partir de <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. e suas combinações	2013
RU2295403	<i>Rhodococcus ruber, Rhodococcus erythropolis</i>	2007
PI1020150254229	Uso de consórcio, porém sem identificação de gênero ou espécie	2015

**Tabela 3**

Patentes de invenção que utilizam um micro-organismo individualmente para a degradação de petróleo com a relação do gênero e/ou espécie de cada micro-organismo utilizado, bem como seu ano de publicação.

Patente	Micro-organismo	Ano
PI0500997-9	<i>Paraconiothyrium</i>	2005
CN101186890	<i>Burkholderia cepacia</i>	2010
CN101514329	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2011
CN101531974	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	2009
CN101560483	<i>Bacillus pumilus</i>	2010
CN101607120	<i>Bacillus</i> sp.	2009
CN101838623	<i>Pseudomonas veronii</i>	2011
CN101974442	<i>Achronobacter</i> sp.	2011
CN102021128	<i>Paraccocus</i> sp.	2012
CN102174445	<i>Acinetobacter</i> sp.	2012
CN102533586	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	2013
GB2482286	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	2012
RU2344170	<i>Pseudomonas putida</i>	2009
RU2484130	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	-
RU2513702	<i>Bacillus vallismortis</i>	-
US20100276362	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	2010
WO2007003779	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2007

“-” Sem informação referente ao ano de publicação.

Diante desta situação mundial, o desenvolvimento de pesquisas que tenham como objetivo o estabelecimento de consórcios de micro-organismos nativos e comprovadamente degradadores de petróleo é de fundamental importância, visto que visam a otimização no processo de limpeza e no tratamento de ambientes contaminados com petróleo.

E para ampliar o potencial dos processos de degradação de petróleo por consórcios de micro-organismos, podem ser desenvolvidas técnicas de imobilização, a fim de que sejam preservadas as características dos micro-organismos, o que possibilita a aplicação tanto em escala laboratorial quanto industrial.

### 3. Imobilização dos consórcios de micro-organismos

A imobilização consiste no confinamento físico de micro-organismos em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas (Covizzi et al., 2007), e a mesma apresenta muitas vantagens sobre o uso de células livres para o tratamento de poluentes (Mollaei et al., 2010). Tem como função proteger as células e/ou consórcios da competição natural com os micro-organismos presentes no solo (Chen et al., 2007; Hsieh et al., 2008; Wang et al., 2012) e também contra estresses ambientais (Banerjee e Ghoshal, 2011; Lin et al., 2014). Ainda, tem um papel muito importante na proteção contra a toxicidade do contaminante (Chen et al., 2007; Wang et al., 2012), potencializando os micro-organismos em tolerarem concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (Ha et al., 2009; Patil et al., 2006). Além disso, é utilizada visando uma liberação microbiana contínua em ambientes contaminados, tais como solo e água (Boon et al., 2002; Mertens et al., 2006).

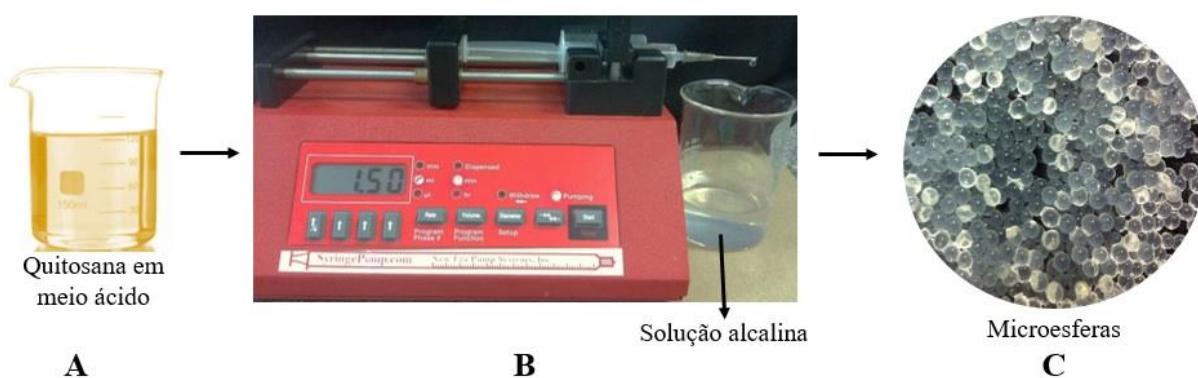
Suportes, baseados principalmente em polímeros naturais, são empregados no processo de imobilização de células, fármacos e biomoléculas, devido à sua biocompatibilidade (Elnashar, 2011; Guibal et al., 2004; Krajewska, 2004). São exemplos de suportes: celulose, alginato, quitina, quitosana e agarose (Elnashar, 2011; Guibal et al., 2004; Krajewska, 2004), dentre os quais a quitosana se destaca por ser o mais utilizado para a imobilização de micro-organismos que degradam petróleo (Carvalho, 2006; Gentili et al., 2006), devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, inércia fisiológica e disponibilidade na natureza (Kumar, 2000; Kurita, 2006).

A quitosana é um heteropolissacarídeo hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, embora também ocorra naturalmente na parede celular de alguns fungos (Angelim et al., 2013; Chatterjee et al., 2005; Gentili et al., 2006; Kurita, 2006). É crescente sua importância e utilização como adsorvente em processos de recuperação e/ou de purificação de bioprodutos, como as proteínas (Torres et al., 2005). É também amplamente utilizada como matéria-prima no desenvolvimento de biomateriais, como membranas, filmes, filtros e microsferas, os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (Guibal, 2004; Guibal, 2005).

A imobilização celular pode ocorrer de diferentes formas: floculação, ligação covalente a carreadores, adsorção a superfícies, ligação cruzada entre células, aprisionamento em matrizes e encapsulamento (Gomes, 2007), sendo os dois últimos os mais utilizados.

O preparo de microesferas é um método de imobilização por aprisionamento em gel, em que as células microbianas ficam envoltas e submersas em uma membrana polimérica (Covizzi et al., 2007; Guibal, 2004), garantindo maior proteção às variações ambientais e aumentando a viabilidade celular (Lin et al., 2014).

Há várias metodologias que podem ser utilizadas para o preparo e obtenção destas microesferas de quitosana, como métodos de secagem por atomização, método de emulsão e método de coagulação (Torres et al., 2005). A técnica mais simples e mais utilizada, no entanto, é a coagulação, na qual a quitosana é dissolvida em meio ácido e gotejada com o auxílio de uma seringa em solução alcalina para formação das microesferas (Carvalho, 2006; He et al., 1999; Wang et al., 2005), representado na Fig. 2.



**Fig. 2.** Método de coagulação para formação de microesferas. A - A quitosana é dissolvida em uma solução contendo ácido. B - Com o auxílio de uma seringa é gotejada em uma solução alcalina, onde as microesferas são formadas. C - Aspecto das microesferas contendo micro-organismos encapsulados.

Essas microesferas contendo micro-organismos, e formadas por meio do aprisionamento em gel, estão sendo utilizadas para a captura e degradação de compostos tóxicos, permitindo uma descontaminação ambiental rápida (Junter e Jouenne, 2004; Tyagi et al., 2011). Dentre esses, destacam-se os resíduos de petróleo, exemplificados nas pesquisas de Hsieh et al. (2008) e Quek et al. (2005), em que células bacterianas de *Pseudomonas putida* e *Rhodococcus* sp., respectivamente, foram imobilizadas com o objetivo de degradar e/ou remover hidrocarbonetos e derivados de petróleo. Hsieh et al. (2008) demonstraram que a imobilização bacteriana em microesferas de quitosana aumentou a tolerância das células às altas concentrações do contaminante e melhorou a sobrevivência, crescimento e taxas de degradação

das células. Quek et al. (2005) verificaram que as células bacterianas imobilizadas foram capazes de degradar aproximadamente 90% do total de alcanos presentes nos derivados de petróleo em sete dias.

Quando comparada ao uso de micro-organismos livres, a principal vantagem da imobilização reside no fato dos micro-organismos estarem protegidos contra a ação tóxica dos contaminantes, possibilitando maior eficiência como agentes nos processos de biodegradação (Carvalho, 2006; Gomes, 2007; Mollaei et al., 2010). Deste modo, a imobilização de consórcios de micro-organismos degradadores de petróleo pode ser utilizada como uma forma de otimização da técnica de biorremediação para o tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados.

#### **4. Conclusão**

O estabelecimento e a utilização de consórcios de micro-organismos degradadores de petróleo apresenta-se como uma técnica promissora na remediação de ambientes contaminados, visto que, por meio da cooperação sinérgica entre estes micro-organismos, os diversos componentes do petróleo podem ser mineralizados.

Cabe destacar, também, que estes consórcios podem ser imobilizados por meio do uso de suportes, como a quitosana, tendo como principais vantagens a proteção destes micro-organismos frente à toxicidade do contaminante, proteção contra a competição com a microbiota local e a preservação da atividade catalítica. Deste modo, ressalta-se a importância de novas pesquisas para o estabelecimento de consórcios de micro-organismos degradadores de petróleo, que possam ser imobilizados e utilizados como forma de otimização do processo de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados.

#### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo (UP) pelo apoio e assistência para a realização e o desenvolvimento do presente estudo.



## Referências

- Agência Internacional de Energia, 2013. Key word energy statistics.
- Almeda, R., Connelly, T.R., Buskey, E.J., 2014. Novel insight into the role of heterotrophic dinoflagellates in the fate of crude oil in the sea. *Sci. Rep.* 4, 01-09.
- Andrade, J.A., Augusto, F., Jardim, I.C.S.F., 2010. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét. Quim.* 35, 17-43.
- Angelim, A.L., Costa, S.P., Farias, B.C.S., Aquino, L.F., Melo, V.M.M., 2013. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *J. Environ. Manage.* 127, 10-17.
- Bacosa, H.P., Inoue, C., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *J. Hazard. Mater.* 283, 689-697.
- Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., 2012. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 112, 83-90.
- Banerjee, A., Ghoshal, A.K., 2011. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *Inter. Biodeterior. Biodegradation* 65, 1052-1060.
- Banković-Ilić, I.B., Stamenković, O.S., Veljković, V.B., 2012. Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 3621-3647.
- Bazot, S., Lebeau, T., 2009. Effect of immobilization of a bacterial consortium on diuron dissipation and community dynamics. *Bioresour. Technol.* 100, 4257-4261.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B., Frankenberger-Júnior, W.T., 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz. J. Microbiol.* 34, 65-68.
- Boon, N., Gelder, L.D., Lievens, H., Siciliano, S., Top, E., Verstraete, W., 2002. Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4698-4704.
- Brakstad, O.G., Faksness, L.G., Melbye, A.G., 2002. Depletion of compounds from thin oil films in seawater. *AMOP.* 33, 921-940.
- Cameotra, S.S., Singh, P., 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Inter. Biodeterior. Biodegradation.* 62, 274-280.
- Cantagallo, C., Milanelli, J.C.C., Dias-Brito, D., 2007. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Panan. J. Aquat. Sci.* 2, 1-12.

- Cao, B., Nagarajan, K., Loh, K.C., 2009. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 207-228.
- Carvalho, T.C., 2006. Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo. (Dissertação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Chaîneau, C.H., Yepremian, C., Vidalie, J.F., Ducreux, J., Ballerini, D., 2003. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollut.* 144, 419-440.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P., 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process. Biochem.* 40, 395-400.
- Chen, Y.M., Lin, T.F., Huang, C., Lin, J.C., Hsieh, F.M., 2007. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J. Hazard. Mater.* 148, 660- 670.
- Colla, L.M., Costa, J.A.V., 2003. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor* 13, 85-103.
- Confederação Nacional da Indústria, 2007. Matriz Energética: Cenários, Oportunidades e Desafios CNI. Brasília: Confederação Nacional da Indústria - CNI.
- Costa, A.F.S., Silva, J.R.R., Santos, R.C.M.M., Farias, C.B.B., Sarrubo, L.A., Jordão, R.C.C., Salgueiro, A.A., 2007. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. *Centro de Ciências e Tecnologia* 1, 1-7.
- Covizzi, L.G., Giese, E.C., Gomes, E., Dekker, R.F.H., Silva, R., 2007. Imobilização de células microbianas e suas aplicações tecnológicas. *Semina: Tech. Ex.* 28, 143-160.
- Crapez, M.A.C., Borges, A.L.N., Bispo, M.G.S., Pereira, D.C., 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje* 30, 32-37.
- Dellagnezze, B.M., Sousa, G.V., Martins, L.L., Domingos, D.F., Limache, E.E.G., Vasconcellos, S.P., Cruz, G.F., Oliveira, V.M., 2014. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 191-200.
- Dindar, E., Sagban, F.O.T., Baskaya, H.S., 2013. Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil. *J. Environ. Biol. Sci.* 19, 39-47.
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268-275.
- Elnashar, M.M.M., 2011. The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology. In: Elnashar MMM (Ed.), *Biotechnology of Biopolymers*, 2011, 3-32.
- EPA, 2006. *Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons*. 1-171.

- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N.G., Poggi-Varaldo, H.M., Alárcon, A., Cañizares-Villanueva, R.O., 2006. Procesos de biorremediación de suelo u agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48, 179-187.
- Gallego, J.L.R., García-Martínez, M.J., Llamas, J.F., Belloch, C., Peláez, A.I., Sánchez, J., 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation* 18, 269-281.
- Gao, X., Gao, W., Cui, Z., Han, B., Yang, P., Sun, P., Zheng, L., 2015. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Pollut. Bull.* 97, 373-380.
- Gaylarde, C.C., Bento, F.M., Kelley, J., 1999. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev. Microbiol.* 30, 1-10.
- Gentili, A.R., Cubitto, M.A., Ferrero, M., Rodríguez, M.S., 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 57, 222-228.
- Gomes, R.V., 2007. Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos. (Dissertação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Gonçalves, A., Granziera, M.L.M., 2012. Petróleo, gás e meio ambiente. Santos: Editora Universitária Leopoldianum.
- González, N., Simarro, R., Molina, M.C., Bautista, L.F., Delgado, L., Villa, J.A., 2011. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresour. Technol.* 102, 9438-9446.
- Guedes, C.L.B., Correr, C.J., Lobo, I., Abi-Saab, O.J.G., 2010. Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. *Semina: Tech. Ex.* 31, 87-100.
- Guibal, E., 2004. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a Review. *Separ. Purif.* 38, 43-74.
- Guibal, E., 2005. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Prog. Polym. Sci.* 30, 71-109.
- Ha, J., Engler, C.R., Wild, J.R., 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresour. Technol.* 100, 1138-1142.
- He, P., Davis, S.S., Illum, L., 1999. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. *J. Microencapsulation.* 16, 343-355.

- Hsieh, F.M., Huang, C., Lin, T.F., Chen, Y.M., Lin, J.C., 2008. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process. Biochem.* 43, 83-92.
- Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O., 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc. Rural.* 37, 1192-1201.
- Jacques, R.J.S., Silva, K.J., Bento, F.M., Camargo, F.A.O., 2010. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Cienc. Rural.* 40, 310-317.
- Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *J. Hazard. Mater.* 187, 333-340.
- Jasmine, J., Mukherji, S., 2015. Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia. *J. Environ. Manage.* 149, 118-125.
- Junter, G.A., Jouenne, T., 2004. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome. or the cart before the horse. *Biotech. Adv.* 22, 633-658.
- Kisic, I., Mesic, S., Basic, F., Brkic, V., Mesic, M., Durn, G., Zgorelec, Z., Bertovic, L., 2009. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma.* 149, 209-216.
- Krajewska, B., 2004. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme. Microb. Tech.* 35, 126-139.
- Kumar, G., Vijayakumar, L., Joshi, G., Peter, D.M., Dharani, G., Kirubakaran, R., 2014. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresour. Technol.* 170, 556-564.
- Kumar, M.N.V., 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46, 1-27.
- Kurita, K., 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* 8, 203-226.
- Lai, C., Huang, Y.C., Wei, Y., Chang, J., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167, 609-614.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., Li, G., 2009. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 80-87.
- Lin, M., Liu, Y., Chen, W., Wang, H., Hu, X., 2014. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 88, 8-12.

- Liu, W., Sun, J., Ding, L., Luo, Y., Chen, M., Tang, C., 2013. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assisted phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). *Plant. Soil.* 371, 533-542.
- Lotfinasabasl, S., Gunale, V.R., Rajurkar, N.S., 2013. Petroleum Hydrocarbons Pollution in Soil and its Bioaccumulation in mangrove species, *Avicennia marina* from Alibug Mangrove Ecosystem, Maharashtra, India. *IJOART.* 2, 1-7.
- Lu, X.X., Zhang, X., Li, G.H., Zhang, W.H., 2003. Production of biosurfactant and its role in the biodegradation of oil hydrocarbons. *J. Environ. Sci. Health. A.* 38, 483-492.
- Luqueño, F., Encinas, V.C., Marsch, R., Martinez-Suarez, C., Vazquez-Nunez, E., Dendooven, L., 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 12-30.
- Malik, Z.A., Ahmed, S., 2012. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *Afri. J. Biotechnol.* 11, 650-658.
- Mandri, T., Lin, J., 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 23-27.
- Mao, J., Luo, Y., Teng, Y., Li, Z., 2012. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 70, 141-147.
- Maqbool, F., Wanga, Z., Xu, Y., Zhao, J., Gao, D., Zhao, Y., Bhattid, Z.A., Xing, B., 2012. Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *J. Hazard. Mater.* 237-238, 262-269.
- Mariano, A.P., Kataoka, A.P.A.G., Angelis, D.F., Bonotto, D.M., 2007. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz. J. Microbiol.* 38, 346-353.
- McGuinness, M., Dowling, D., 2009. Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 6, 2226-2247.
- Medina-Moreno, S.A., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., 2005. Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil contaminated-soil. *Can. J. Microbiol.* 51, 231-239.
- Mei, H., Yin, Y., 2009. Studies on marine oil spills and their ecological damage. *J. Ocean. Univ.* 8, 312-316.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C., 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water. Air. Soil. Poll.* 165, 195-209.
- Mertens, B., Boon, N., Verstraete, W., 2006. Slow-release inoculation allows sustained biodegradation of c-hexachlorocyclohexane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 622-627.

- Michel, J., Henry, C.B., Thumm, S., 2002. Shoreline assessment and environmental impacts from the M/T Westchester oil spill in the Mississippi River. *Sci. Technol. Bull.* 7, 155-161.
- Mohanty, S., Jasmine, J., Mukherji, S., 2013. Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. *BioMed. Res. Int.* 2013, 1-16.
- Mollaei, M., Abdollahpour, S., Atashgahi, S., Abbasi, H., Masoomi, F., Rad, I., Lotfi, A.S., Zahiri, H.S., Vali, H., Noghabi, K.A., 2010. Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gainging insight into the novel single and hybrid immobilizations. *J. Hazard. Mater.* 175, 284-292.
- Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F.J., Sanromán, M.A., 2012. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour. Technol.* 119, 270-276.
- Owsianiak, M., Chrzanowski, L., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A.K., Heipieper, H.J., 2009. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresour. Technol.* 100, 1497-1500.
- Pandey, J., Chauhan, A., Jain, R.K., 2009. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. *FEMS. Microbiol. Rev.* 33, 324-375.
- Patil, N.K., Veeranagouda, Y., Vijaykumar, M.H., Nayak, S.A., Karegoudar, T.B., 2006. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. Immobilized cells in alginate and polyurethane. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 57, 82-87.
- Pezeshki, S.R., Hester, M.W., Lin, Q., Nyman, J.A., 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ. Pollut.* 108, 129-139.
- Pothuluri, V.J., Cerniglia, E.C., 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R.G Chaudry (ed.). *Biological Degradation and Biorremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides. Portland, 92-123, 1994.
- Quek, E., Ting, Y.P., Tan, H.M., 2005. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresour. Technol.* 97, 32-38.
- Ramos, D.T., Maranhão, L.T., Godoi, A.F.L., Carvalho Filho, M.A.S., Lacerda, L.G., Vasconcelos, E.C., 2009. Petroleum hydrocarbons rhizodegradation by *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. SM. & Downs. *Water. Air. Soil. Poll.* 9, 293-302.
- Rani, R., Juwarkar, A., 2012. Biodegradation of phorate in soil and rhizosphere of *Brassica juncea* (L.) (Indian Mustard) by a microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 71, 36-42.
- Roy, A.S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A.K., Boruah, H.P.D., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., Bora, T.C., 2014. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial

strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 94, 79-89.

Ruberto, L.A.M., Vazquez, S.C., Curtosi, A., Mestre, M.C., 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediat. J.* 10, 191-201.

Seo, J., Keyn, Y., Li, Q.X., 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Inter. J. Environ. Res. Public. Health*. 6, 278-309.

Sloan, N.A., 1999. Oil impacts on cold-water Marine Resources: A review relevant to Parks Canada's evolving Marine Mandate. *Occasional Paper* 11, 1-10.

Speight, J.G., Arjoon, K.K., 2012. *Bioremediation of Petroleum and Petroleum products*.

Speight, J.G., 2014. *The Chemistry and Technology of Petroleum*.

Tabatabaee, A., Assadi, M.M., Noohi, A.A., Sajadian, V.A., 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *JEHSE*. 2, 6-12.

Tyagi, M., Da Fonseca, M.M.R., De Carvalho, C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22, 231-241.

Tian, Y., Liu, H.J., Zheng, T.L., Kwon, K.K., Kim, S.J., Yan, C.L., 2008. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 707-715.

Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Leal, E.S., 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim. Nova*. 27, 441-446.

Tonini, R.M.C.W., Rezende, C.E., Grativol, A.D., 2010. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia. Australis*. 14, 1025-1035.

Torres, M.A., Vieira, R.S., Beppu, M.M., Santana, C.C., 2005. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros*. 15, 306-312.

Ururahy, A.F.P., Pereira, N.J., Marins, M.D.M., 1998. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. *Boletim Técnico da Petrobrás*. 41, 125-132.

Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67, 503-549.

Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S., Upasani, V.N., 2015. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *Inter. Biodeterior. Biodegradation*. 103, 116-124.

- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M., 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol. Adv.* 23, 115-129.
- Wang, Z.Y., Xu, Y., Wang, H.Y., Zhao, J., Gao, D.M., Li, F.M., Xing, B., 2012. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere.* 22, 717-725.
- White, P.M., Wolf, D.C., Thoma, G.J., Reynolds, C., 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water. Air. Soil. Poll.* 169, 207-220.
- Xu, N., Bao, M., Sun, P., Li, Y., 2013. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 149, 22-30.
- Xu, S.Y., Chen, Y.X., Wo, W.X., Wang, K.X., Lin, Q., Lian, X.Q., 2006. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Sci. Total. Environ.* 363, 206-215.
- Zafra, G., Absalón, A.E., Cuevas, M.D., Cortés-Espinosa, D.V., 2014. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water. Air. Soil. Pollut.* 225, 1826-1844.
- Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., Tam, N.F.Y., 2011. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. *Bioresour. Technol.* 102, 2965-2972.



## CAPÍTULO III

### Seleção de bactérias degradadoras de petróleo extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras

Suellyn Homan & Leila Teresinha Maranhão

#### Resumo

Devido à grande demanda energética mundial, acidentes envolvendo derrames de petróleo, e a conseqüente contaminação ambiental, vêm aumentando. Com isso, surge a necessidade do uso e desenvolvimento de técnicas de remediação que possam degradar contaminantes, dentre as quais, a biorremediação se destaca. Neste sentido, objetivou-se avaliar a capacidade de sete bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras para a degradação de petróleo. Estas foram testadas em meio mineral e petróleo como fonte de carbono, nos intervalos de tempo 0, 24, 48 e 72 horas, sendo mensurados: pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), biomassa (BIO) e densidade óptica (DO). Também foi analisada a degradação de hidrocarbonetos por Cromatografia a Gás e produção de biossurfactante. Os resultados indicam que *Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup> e *Bacillus* sp.<sup>5</sup> são tolerantes e eficientes degradadoras, com capacidade de produzir biossurfactante. Porém, *Microbacterium* sp. e *Stenotrophomonas* sp. apresentaram-se como as mais eficazes para a degradação dos compostos de petróleo em 24 e 48 horas. Cabe destacar a importância dos parâmetros CE, OD, BIO e DO, comprovadamente relacionados ao processo de degradação. Ressalta-se a importância destes resultados para o desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas de biorremediação para o tratamento de áreas contaminadas com petróleo.

*Palavras-chave:* Poluição; petroderivados; rizodegradação; micro-organismos rizodegradadores.

#### Introdução

O petróleo, óleo de origem fóssil, é uma mistura complexa de vários hidrocarbonetos diferentes, ramificados e cíclicos, alifáticos lineares, aromáticos e compostos heterocíclicos (Gaylarde *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2010; Tonini *et al.*, 2010).

Levou milhões de anos para ser formado nas rochas sedimentares e representa a maior fonte energética mundial (Das & Chandran, 2011; Speight, 2012).

Devido à ampla demanda energética, a indústria de petróleo é responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos de óleos viscosos, que são formados durante o processamento e produção de petróleo, e são compostos por água, óleo e sólidos (Ururahy *et al.*, 1998; Guedes *et al.*, 2010). Esta sua composição variada acarreta no difícil reaproveitamento, constituindo um passivo ambiental, altamente tóxico e persistente quando exposto ao ambiente (Coutinho & Barbosa, 2007; Guedes *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014).

Além dos impactos negativos causados pela indústria petrolífera, a contaminação de sistemas marinhos e terrestres vem aumentando, como resultado da exploração, produção, distribuição e armazenamento de petróleo e seus derivados (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2014). As principais causas de contaminação associam-se a vazamentos em tubulações e tanques de estocagem, ao despejo de resíduos no solo e aos derramamentos acidentais (Santos *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Neste ambiente de contraste, em que é preciso conciliar a demanda crescente de petróleo com a proteção ambiental, surge a necessidade da busca por técnicas eficientes, de baixo custo e mais sustentáveis que possam ser aplicadas na remediação dos contaminantes no ambiente (Farias *et al.*, 2009; Makadia *et al.*, 2011; Molinos-Senante *et al.*, 2015).

A fitorremediação, fitotecnologia emergente e relativamente nova, que utiliza plantas para degradar, extrair, conter ou imobilizar contaminantes do solo e da água (Cunningham *et al.*, 1996; Pires *et al.*, 2003; USEPA, 2006; Landmeyer *et al.*, 2011; Nie *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Sabir *et al.*, 2015), vem demonstrando grande potencial para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo (Pilon-Smits, 2005; USEPA, 2006; Farias *et al.*, 2009; Gerhardt *et al.*, 2009). As plantas, no entanto, atuam indiretamente nesse processo, uma vez que estimulam o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos degradadores de petróleo no solo (rizosfera), por meio da disponibilização de oxigênio, açúcares, aminoácidos e outros compostos, liberados através de suas raízes, processo denominado de rizodegradação (Siciliano & Germida, 1998; EPA, 2006; Santos *et al.*, 2007; Gerhardt *et al.*, 2009; Soleimani *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2013; Ighovie & Ikechukwu, 2014).

Na rizosfera, região do solo sob influência direta das raízes, ocorre a maior parte das interações entre os micro-organismos e as plantas (Macek *et al.*, 2000; EPA, 2006; Prashar *et*

*al.*, 2014). Nessa região há uma elevada estabilidade das propriedades físicas e químicas do solo, além do constante fornecimento de substratos orgânicos e fatores de crescimento que favorecem a atividade metabólica dos micro-organismos que degradam os hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e energia (Merkl *et al.*, 2005; EPA, 2006; Dantas *et al.*, 2009; Wetler-Tonini *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2013; Prashar *et al.*, 2014), caracterizando o processo de biorremediação.

A biorremediação vem recebendo especial atenção, em termos científicos e tecnológicos, por ser um processo de baixo custo e ambientalmente correto quando comparado aos processos físicos e químicos (Bento *et al.*, 2003; Dua *et al.*, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2010; Pasumarthi *et al.*, 2013). O emprego de micro-organismos, nativos ou cultivados, para a biorremediação, se destaca como tecnologia exequível e promissora, tanto para o tratamento de resíduos tóxicos quanto para a descontaminação de áreas contaminadas com petróleo (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006; Perelo, 2010; Deon *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2015).

*Sesbania punicea* (Cav.) Benth, Fabaceae, *Mimosa scabrella* Benth, Mimosaceae e *Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc., Poaceae são plantas nativas da região Sul do Brasil e capazes de se desenvolver em ambientes contaminados com petróleo, podendo reduzir a sua toxicidade por meio da fitorremediação (Hutchinson *et al.*, 2001; Lopes & Piedade, 2009; Rivera-Cruz *et al.*, 2001). É necessário, porém, conhecer a população de micro-organismos associados à rizosfera dessas plantas quando crescem em ambientes contaminados com petróleo, pois esses organismos podem constituir uma inovação biotecnológica em processos de remediação de solos contaminados (Faulwetter *et al.*, 2009).

Diante deste contexto, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a capacidade de bactérias, selecionadas a partir da rizosfera dessas espécies de plantas, para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, com a possibilidade de aplicação para a remediação de ambientes contaminados.

## **Material e métodos**

Sete bactérias, extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras, constituem o objeto de estudo da presente pesquisa. Destas, quatro foram extraídas da rizosfera de *E. polystachya*, duas da rizosfera de *M. scabrella* e uma extraída de *S. punicea*. Estas bactérias foram

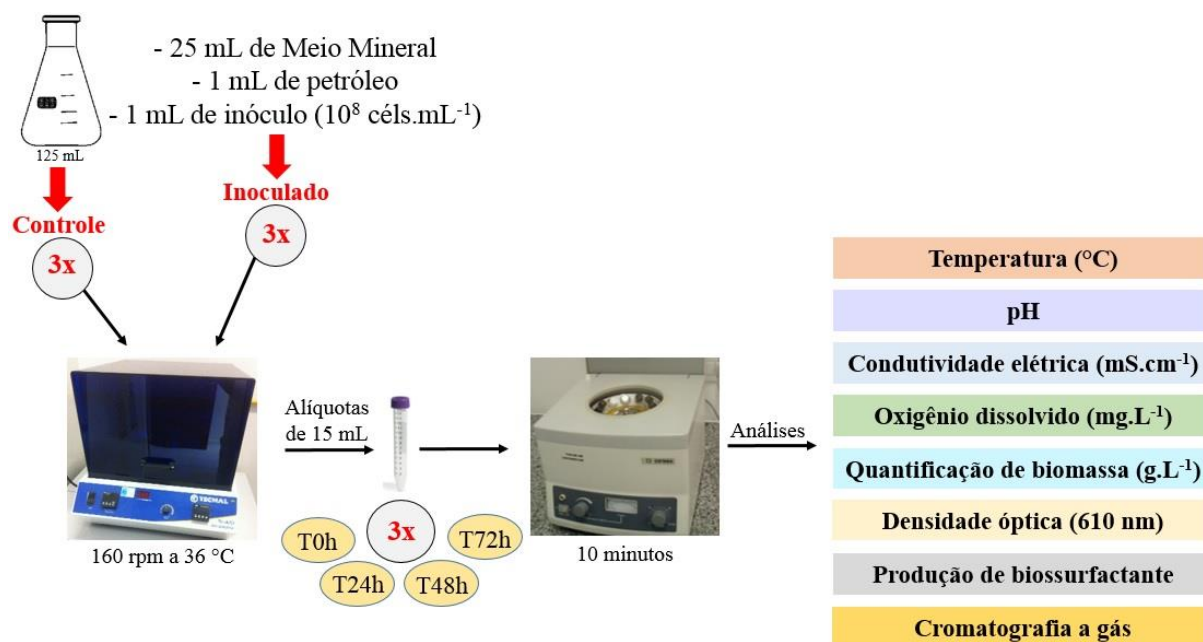
identificadas em nível molecular, sendo cinco delas pertencentes ao gênero *Bacillus*, uma pertencente ao gênero *Stenotrophomonas* e uma ao gênero *Microbacterium*.

Inicialmente, para determinar a concentração inicial dos inóculos, foram preparadas, para cada bactéria, diluições  $10^8$  céls.mL<sup>-1</sup>, a partir da contagem do número de células em Câmara de Neubauer. Três alíquotas de 300 µL desta diluição e para cada bactéria foram transferidas para uma microplaca de cultivo celular e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro SpectraMAX M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) no comprimento de onda de 610 nm (DO<sub>610 nm</sub>).

### Testes de degradação de petróleo com as bactérias

O petróleo utilizado para o estabelecimento do experimento possui as seguintes características: densidade relativa (20±4 °C) de 0,90; densidade (°API) de 23,8; número de acidez total de 1,02 (mg.g<sup>-1</sup> KOH); teor de sal de 202 (mg.L<sup>-1</sup> NaCl); conteúdo de água e sedimentos de 0,60%; além de 49,8% de hidrocarbonetos saturados; 25,4% de hidrocarbonetos aromáticos; 22,4% de resinas de hidrocarbonetos e 2,4% de asfaltenos.

Os procedimentos empregados para avaliar o crescimento e o potencial de degradação de petróleo pelas bactérias analisadas estão descritos na Fig. 1.

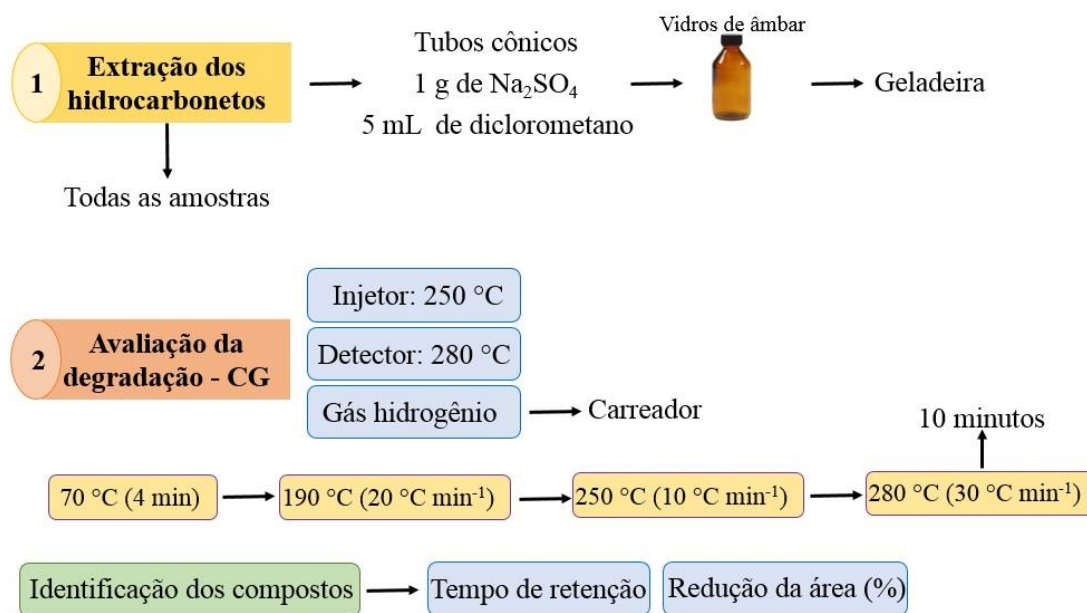


**Fig. 1.** Esquema representativo que demonstra o estabelecimento dos testes de degradação de petróleo pelas bactérias testadas.

Foram realizados, em triplicata, testes nos intervalos de tempo T0, T24, T48 e T72 horas, utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 125 mL como reatores, contendo 25 mL de meio mineral ( $K_2HPO_4$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $MgSO_4.7H_2O$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $FeCl_2.1H_2O$  - 10 mg.L<sup>-1</sup>;  $MnCl_2$  - 0,1 mg.L<sup>-1</sup>;  $ZnSO_4$  - 0,01 mg.L<sup>-1</sup>;  $CaCl_2$  - 10 mg.L<sup>-1</sup>) (adaptado de Déziel *et al.*, 1996), 1,0 mL de petróleo, como única fonte de carbono, e 1,0 mL de inóculo ( $10^8$  céls.mL<sup>-1</sup>), conforme metodologia proposta por Mishra *et al.* (2004). Para cada intervalo de tempo foram preparados ainda, em triplicata, três frascos que não receberam a inoculação de bactérias (tratamento controle - TC).

Os reatores foram mantidos em incubadora refrigerada “shaker” TE-420 sob agitação de 160 rpm e em temperatura de 36 °C. Para cada intervalo de tempo, foram retiradas alíquotas de 15 mL das suspensões, que foram armazenadas e centrifugadas em tubos cônicos por 10 minutos a 9000 rpm. A fase menos densa (petróleo) foi descartada e a fase aquosa resultante foi analisada quanto à temperatura e pH com o auxílio de pHmetro TCP01 (Onda Científica, Campinas, Brasil), concentração de oxigênio dissolvido com oxímetro Handylab OX12-Set (SI Analytics, Mainz, Alemanha), condutividade elétrica em condutivímetro Handylab LF11 (SI Analytics, Mainz, Alemanha) e densidade óptica em espectrofotômetro SpectraMAX M3 no comprimento de onda de 610 nm. Para análise de densidade óptica, empregou-se como branco o meio mineral. Ainda, realizou-se a análise gravimétrica para quantificação da biomassa bacteriana para cada intervalo de tempo e repetição. Foram adicionados 5 mL de amostra nos tubos, e estes foram centrifugados a 9000 rpm por 20 minutos e, após descartado o sobrenadante, transferidos para estufa a 105 °C, até atingirem peso constante (adaptado de Makkar & Cameotra, 1998). Em seguida, calculou-se a concentração de biomassa para cada amostra em g.L<sup>-1</sup>.

As amostras obtidas foram avaliadas quanto à degradação de petróleo por meio da extração e quantificação dos hidrocarbonetos totais, seguidos pela avaliação da degradação de petróleo por Cromatografia a gás, como pode ser observado na Fig. 2.



**Fig. 2.** Esquema representativo dos procedimentos realizados para extração e quantificação dos hidrocarbonetos de petróleo, avaliação da degradação por meio de Cromatografia à gás (CG), bem como a identificação dos compostos.

A extração foi realizada em tubos cônicos. Após adição de 10 mL de cada amostra, foram acrescentados 1 g de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para desidratação e 5 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) padrão cromatografia como solvente (Schwab *et al.*, 1999). As amostras permaneceram armazenadas em vidros âmbar, na geladeira, até a avaliação por CG.

Para a quantificação dos hidrocarbonetos, foi utilizado um cromatógrafo a gás GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) e uma coluna capilar HP-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano (0,25  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 30 m de comprimento e 0,25  $\mu\text{m}$  de largura). As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente, e gás hidrogênio foi utilizado como carreador (1,0 mL.min<sup>-1</sup>). A temperatura da coluna foi inicialmente ajustada para 70 °C (4,0 min) e aumentada até 190 °C a uma taxa de 20 °C.min<sup>-1</sup>, para posteriormente ser elevada a 250 °C a 10 °C.min<sup>-1</sup> e finalmente alcançar 280 °C a 30 °C.min<sup>-1</sup> que foi mantida por 10 minutos. O volume injetado de cada amostra foi de 0,5  $\mu\text{L}$ . Cada composto foi identificado com base em seus tempos de retenção e porcentagem de redução de área (Fig. 2).

### Avaliação da capacidade de produção de biosurfactante

Com a finalidade de avaliar a capacidade de produção de biosurfactante pelas bactérias, 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana ( $10^8$  céls.mL<sup>-1</sup>) foram inoculados separadamente em uma

placa multipoços, antecipadamente preenchidos com 50 µL de óleo mineral. Após um minuto de reação, o resultado foi determinado em Microscópio Estereoscópio, considerando-se positiva a produção de biossurfactante quando houve colapso da gota de petróleo (Jain *et al.*, 1991), sendo as reações classificadas em: fortemente positiva, positiva e negativa.

### **Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel 2010 sendo, posteriormente, calculados os valores de média e desvio padrão. A análise estatística foi conduzida pelo software Past, versão 3.10. Inicialmente foram efetuados testes para verificar a distribuição dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk. Os que apresentaram distribuição normal, foram comparados pelo teste paramétrico *T Student* (t), considerando diferenças significativas em que  $p \leq 0,05$ . Já os que não atenderam ao pressuposto de normalidade foram comparados por meio do teste não paramétrico Mann-Whitney, considerando diferenças significativas em que  $p \leq 0,05$ .

Para verificar as correlações entre os parâmetros, aplicou-se também o teste de correlação de postos de Spearman (r), sendo considerados os valores de referência conforme Callegari-Jacques (2003), em que a- correlação negativa fraca ( $0 < r > -0,3$ ); b- negativa regular ( $-0,3 \leq r < -0,6$ ); c- negativa forte ( $r \geq -0,6$ ); d- negativa muito forte ( $r = -1,00$ ); e- negativa perfeita; f- nula ( $r = 0,00$ ); g- positiva fraca ( $0 < r > 0,30$ ); h- positiva regular ( $0,30 \leq r < 0,60$ ); i- positiva forte ( $r \geq 0,60$ ); j- positiva muito forte; k- positiva perfeita ( $r = 1,00$ ).

### **Resultados e discussão**

Os resultados referentes aos parâmetros analisados como, pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), biomassa por gravimetria (BIO) e densidade óptica ( $DO_{610 \text{ nm}}$ ), encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

*Bacillus* sp.<sup>1</sup> apresentou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para T, CE, BIO e  $DO_{610 \text{ nm}}$  entre os intervalos de tempo (T0, T24, T48 e T72) quando comparados ao controle. Em relação à T, houve diferença significativa nos tempos T24 ( $p=0,09$ ) e T48 ( $p=0,03$ ). A CE diferiu significativamente nos tempos T24 ( $p=0,03$ ) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 1). Para a BIO, observaram-se diferenças significativas para os tempos T24 ( $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,00$ ). Por fim, a  $DO_{610 \text{ nm}}$  diferiu significativamente ( $p=0,00$ ) em todos os tempos analisados (Tabela 2).

**Tabela 1.** Resultados referentes aos parâmetros analisados: pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (CE) durante os testes de degradação de petróleo com as bactérias nos diferentes intervalos de tempo (TB) em comparação aos controles (TC).

	Tempo (h)	Parâmetros							
		pH		T (°C)		OD (mg.L <sup>-1</sup> )		CE (mS.cm <sup>-1</sup> )	
		TC	TB	TC	TB	TC	TB	TC	TB
<i>Bacillus</i> sp. <sup>1</sup>	<b>T0</b>	7,02±0,24	7,18±0,02	33,17±0,45	33,40±0,26	5,55±0,63	5,33±0,10	1349,67±25,11	1416,00±152,75
	<b>T24</b>	7,09±0,05	7,15±0,02	31,40±0,26*	30,43±0,23*	5,35±0,07	5,46±0,17	1023,33±11,93*	1346,00±171,52*
	<b>T48</b>	6,98±0,05	7,07±0,04	30,43±0,50*	29,40±0,20*	5,79±0,48	5,52±0,12	1368,00±66,90	1403,00±53,11
	<b>T72</b>	7,11±0,04	7,08±0,04	28,77±0,38	29,23±0,81	6,41±0,46	5,78±0,42	1264,00±4158*	2256,67±47,26*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup>	<b>T0</b>	7,00±0,07	7,03±0,07	29,70±0,40	30,10±0,40	6,76±0,22*	6,23±0,25*	1175,67±73,51*	1301,67±18,77*
	<b>T24</b>	6,93±0,06	6,94±0,05	30,33±0,78*	32,77±0,35*	5,54±0,51	4,98±0,47	1250,00±85,08*	2556,67±486,86*
	<b>T48</b>	7,03±0,06	6,97±0,05	29,80±0,60	29,97±0,31	5,75±0,25	5,08±0,55	1405,67±18,50	1525,00±92,97
	<b>T72</b>	7,03±0,03	7,03±0,05	29,87±0,31	29,87±0,57	5,81±0,23*	5,18±0,27*	1133,67±123,68*	1573,67±22,12*
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<b>T0</b>	6,90±0,11	6,83±0,28	28,73±0,55*	30,30±0,40*	4,96±0,15	5,73±0,67	1324,33±98,88	1368,00±329,10
	<b>T24</b>	6,96±0,04	6,89±0,02	28,50±0,44	28,97±0,15	6,45±0,45*	4,82±0,18*	1544,67±116,67*	1800,67±36,56*
	<b>T48</b>	6,89±0,08	7,04±0,07	30,10±0,96	29,33±0,57	6,10±0,17	5,49±0,94	1593,00±74,63	1790,33±157,13
	<b>T72</b>	7,05±0,07	6,93±0,08	29,37±0,76	29,53±0,45	6,20±0,21*	5,13±0,32*	1290,00±48,66*	1773,33±44,99*



Tabela 1 (Continuação)

		pH		T (°C)		OD (mg.L <sup>-1</sup> )		CE (mS.cm <sup>-1</sup> )	
		TC	TB	TC	TB	TC	TB	TC	TB
<i>Microbacterium</i> sp.	<b>T0</b>	7,23±0,10	7,34±0,08	28,33±0,91	28,43±0,58	6,37±0,18	6,41±0,27	1364,00±72,06	1480,67±50,01
	<b>T24</b>	7,34±0,13	7,25±0,04	28,87±0,85	27,73±0,50	6,88±0,09*	3,37±0,11*	1317,00±84,26*	1902,67±27,50*
	<b>T48</b>	7,29±0,05	7,21±0,06	28,10±0,53	28,80±0,61	6,05±0,44*	5,07±0,38*	1117,33±127,27*	2061,33±284,58*
	<b>T72</b>	7,19±0,14	7,32±0,08	28,77±0,70	27,63±1,99	6,11±0,16*	5,23±0,31*	1188,00±105,08	1407,33±98,19
<i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup>	<b>T0</b>	7,01±0,03*	6,87±0,05*	32,00±1,30	33,13±0,98	6,82±0,05	6,58±0,47	1378,33±79,10	1369,00±70,00
	<b>T24</b>	6,92±0,08	6,97±0,01	30,93±0,15	31,17±0,15	6,91±0,91*	5,47±0,18*	1372,00±22,34	1500,33±105,81
	<b>T48</b>	6,94±0,01	6,90±0,04	30,73±0,76	30,83±0,68	6,76±0,16	6,71±0,29	1284,67±15,70*	1341,67±19,76*
	<b>T72</b>	6,95±0,05	6,93±0,08	31,07±0,80	31,33±0,64	6,62±0,13	6,36±0,18	1269,33±192,51	1449,00±56,63
<i>Bacillus</i> sp. <sup>4</sup>	<b>T0</b>	6,98±0,05	6,97±0,04	29,33±0,47	29,73±0,50	6,26±0,09	6,20±0,13	1174,67±34,93	1238,33±38,03
	<b>T24</b>	6,87±0,06*	6,66±0,10*	29,67±0,40	29,77±0,45	6,35±0,08*	2,67±0,08*	1280,00±55,83*	1545,67±54,08*
	<b>T48</b>	6,96±0,05*	6,71±0,07*	29,57±0,35	29,70±0,26	6,17±0,06*	3,71±0,27*	1198,00±34,12*	1521,00±58,21*
	<b>T72</b>	6,87±0,05*	6,60±0,09*	29,87±0,31	29,77±0,31	5,64±0,44*	2,16±0,09*	1114,33±83,64*	1450,33±16,44*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>5</sup>	<b>T0</b>	6,70±0,13*	6,53±0,03*	29,10±0,75	30,13±0,35	6,61±0,19	6,64±0,22	1168,33±45,74	1117,33±68,12
	<b>T24</b>	6,96±0,05*	6,51±0,02*	28,17±0,70	29,60±0,79	6,62±0,23*	5,11±0,47*	1118,33±147,62*	1956,33±65,43*
	<b>T48</b>	6,77±0,08*	6,48±0,03*	29,37±0,47	29,80±0,35	6,32±0,49*	4,17±0,09*	1395,00±4,00*	1989,67±66,43*
	<b>T72</b>	6,84±0,06*	6,60±0,08*	29,80±0,26	29,90±0,60	6,38±0,23*	4,38±0,25*	1311,67±69,01*	1559,00±116,58*

**Tabela 2.** Resultados referentes aos parâmetros analisados: biomassa por gravimetria (BIO) e densidade óptica (DO<sub>610 nm</sub>) durante os testes de degradação de petróleo com as bactérias nos diferentes intervalos de tempo (TB) em comparação aos controles (TC).

	Tempo (h)	Parâmetros			
		BIO (g.L <sup>-1</sup> )		DO <sub>610 nm</sub>	
		TC	TB	TC	TB
<i>Bacillus</i> sp. <sup>1</sup>	<b>T0</b>	0,00±0,00	1,00±0,00	0,00±0,00*	0,08±0,01*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	1,33±0,12*	0,00±0,00*	0,11±0,01*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	2,33±0,31*	0,00±0,00*	0,13±0,01*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,33±0,31*	0,00±0,00*	0,08±0,00*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup>	<b>T0</b>	0,00±0,00*	1,00±0,20*	0,00±0,00*	0,10±0,02*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,67±0,12*	0,00±0,00*	0,17±0,01*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	1,33±0,12*	0,00±0,00*	0,14±0,01*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,07±0,12*	0,00±0,00*	0,13±0,02*
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<b>T0</b>	0,00±0,00*	0,93±0,23*	0,00±0,00*	0,08±0,01*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,33±0,23*	0,00±0,00*	0,14±0,02*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	1,13±0,12*	0,00±0,00*	0,13±0,02*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,33±0,42*	0,00±0,00*	0,11±0,02*
<i>Microbacterium</i> sp.	<b>T0</b>	0,00±0,00*	0,93±0,12*	0,00±0,00*	0,07±0,01*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,13±0,12*	0,00±0,00*	0,10±0,01*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	2,47±0,12*	0,00±0,00*	0,16±0,02*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,07±0,23*	0,00±0,00*	0,08±0,01*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup>	<b>T0</b>	0,00±0,00*	1,00±0,20*	0,00±0,00*	0,08±0,01*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,53±0,12*	0,00±0,00*	0,13±0,01*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	1,27±0,12*	0,00±0,00*	0,10±0,01*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,13±0,46*	0,00±0,00*	0,08±0,01*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>4</sup>	<b>T0</b>	0,00±0,00*	0,87±0,12*	0,00±0,00*	0,08±0,01*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,53±0,12*	0,00±0,00*	0,14±0,02*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	2,20±0,20*	0,00±0,00*	0,15±0,02*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,13±0,12*	0,00±0,00*	0,12±0,02*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>5</sup>	<b>T0</b>	0,00±0,00*	0,87±0,12*	0,00±0,00*	0,08±0,00*
	<b>T24</b>	0,00±0,00*	2,33±0,23*	0,00±0,00*	0,16±0,02*
	<b>T48</b>	0,00±0,00*	2,53±0,31*	0,00±0,00*	0,14±0,01*
	<b>T72</b>	0,00±0,00*	1,00±0,20*	0,00±0,00*	0,13±0,02*

Em relação à *Bacillus* sp.<sup>2</sup> observaram-se diferenças significativas para T, OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub>. A T foi estatisticamente maior e diferiu-se significativamente em T24 ( $p=0,00$ ). O OD foi significativamente superior em T0 ( $p=0,05$ ) e T72 ( $p=0,03$ ). Para a CE houve diferença significativa nos tempos T0 ( $p=0,04$ ), T24 ( $p=0,01$ ) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 1). A BIO e a DO<sub>610 nm</sub> diferiram significativamente ( $p=0,00$ ) em todos os intervalos de tempo, T0, T24, T48 e T72 (Tabela 2).

*Stenotrophomonas* sp. apresentou diferença significativa para T, OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub>. Em relação à T, o tempo T0 ( $p=0,02$ ) foi estatisticamente superior as demais. O OD e a CE diferiram significativamente em T24 ( $p=0,00$  e  $p=0,02$ , respectivamente) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 1). A BIO e a DO<sub>610 nm</sub> apresentaram diferença significativa para todos os tempos analisados, T0 ( $p=0,00$ ), T24 ( $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 2).

Para *Microbacterium* sp. as análises estatísticas indicaram diferenças significativas para OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub>. O OD foi significativamente maior em T24 ( $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,04$ ) e T72 ( $p=0,01$ ). A CE diferiu significativamente nos tempos T24 ( $p=0,00$ ) e T48 ( $p=0,00$ ) (Tabela 1). Em relação à BIO e à DO<sub>610 nm</sub>, observaram-se diferenças significativas em todos os tempos, T0 ( $p=0,00$ ), T24 ( $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 2).

Já para *Bacillus* sp.<sup>3</sup> houve diferença significativa no pH, OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub>. O pH foi significativamente superior no tempo T0 ( $p=0,01$ ). Já em relação ao OD, observou-se diferença significativa em T24 ( $p=0,05$ ). Para a CE verificou-se que o tempo T48 foi significativamente maior ( $p=0,02$ ) (Tabela 1). Os valores de BIO diferiram significativamente em todos os tempos ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$ ,  $p=0,00$  e  $p=0,01$ , respectivamente). Para a DO<sub>610 nm</sub> todos os intervalos de tempo apresentaram diferença significativa, sendo  $p=0,00$  (Tabela 2).

Em relação à *Bacillus* sp.<sup>4</sup> verificou-se diferença significativa no pH, OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub> quando comparados ao controle. O pH diferiu significativamente em T24 ( $p=0,03$ ), T48 ( $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,01$ ). O OD e a CE foram significativamente superiores em T24 ( $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,00$ ) (Tabela 1). Já a BIO e a DO<sub>610 nm</sub> demonstraram diferença significativa ( $p=0,00$ ) em todos os tempos analisados, T0, T24, T48 e T72 (Tabela 2).

*Bacillus* sp.<sup>5</sup> apresentou diferença significativa para pH, OD, CE, BIO e DO<sub>610 nm</sub>. O pH foi significativamente maior em todos os intervalos de tempo ( $p=0,09$ ,  $p=0,00$ ,  $p=0,00$  e  $p=0,01$ , respectivamente). O OD e a CE diferiram significativamente em T24 ( $p=0,00$  e  $p=0,00$ ), T48 ( $p=0,00$  e  $p=0,00$ ) e T72 ( $p=0,00$  e  $p=0,03$ ) (Tabela 1). Para a BIO e DO<sub>610 nm</sub> houve diferença significativa ( $p=0,00$ ) em todos os tempos verificados, T0, T24, T48 e T72 (Tabela 2).

De modo geral, o pH apresentou pouca variação nos diferentes intervalos de tempo para os tratamentos com as bactérias inoculadas (TB), permanecendo em uma faixa de 6,48 a 7,34 (Tabela 1), sendo o maior valor de biomassa bacteriana obtido em pH de 6,94. Atagana *et al.* (2003) verificaram que as maiores quantidades de micro-organismos degradadores e as maiores taxas de degradação de hidrocarbonetos de petróleo ocorreram entre pH 6,5 e 7,0, o que condiz com os resultados obtidos. Balachandran *et al.* (2012) também verificaram que as maiores taxas de degradação de hidrocarbonetos de petróleo e óleo diesel por *Streptomyces* sp. ocorreram em um pH 7,0.

Conforme Andrade *et al.* (2010), o processo de biorremediação depende da atividade dos micro-organismos, que é diretamente influenciada pelo pH e temperatura, sendo a faixa ideal de pH entre 6,5 a 8,5. Já para Chen *et al.* (2006), este crescimento microbiano, diretamente afetado pelo pH, é favorecido em uma faixa entre 6,0 a 8,0, o que corrobora também com os resultados obtidos. Conforme Caldwell (2000) o pH interfere na atividade microbiana devido ao efeito dos íons H<sup>+</sup> na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes.

Para a temperatura (T) constatou-se, também, pouca variação nos diferentes intervalos de tempo para as bactérias testadas (TB), sendo relatados os valores de temperatura mínima de 27,63 °C e de temperatura máxima de 33,40 °C (Tabela 1). Tais resultados corroboram com as pesquisas de Balachandran *et al.* (2012) e Liu *et al.* (2016) com *Acinetobacter* sp. e *Streptomyces* sp., respectivamente, em que descrevem a temperatura de 30 °C como ideal para o crescimento e para a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Deng *et al.* (2014) também relatam a biodegradabilidade de hidrocarbonetos de óleo diesel (96,6%) em temperatura de 28 °C por *Achromobacter* sp.

A temperatura desempenha um importante papel na biodegradação de hidrocarbonetos, conforme relatado por Margesin & Schinner (2001). O crescimento e a atividade dos micro-organismos degradadores de petróleo é facilmente afetada pelos valores de temperatura, visto que este parâmetro influencia nas reações bioquímicas, bem como nas propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos (Andrade *et al.*, 2010; Boopathy, 2000; Margesin & Schinner, 2001; Naik & Duraphe, 2012).

Em relação à concentração de oxigênio dissolvido (OD), no presente estudo utilizou-se a agitação em “shaker” de 160 rpm durante todo período experimental e houve uma tendência na redução dos valores em TB, quando comparados ao controle, mas isto não afetou o crescimento dos micro-organismos. De modo geral, o menor valor de OD foi de 2,16 mg.L<sup>-1</sup>, registrado para *Bacillus* sp.<sup>4</sup> e o maior valor foi de 6,71 mg.L<sup>-1</sup> verificado para *Bacillus* sp.<sup>3</sup> (Tabela 1).

A presença de oxigênio é fundamental para que ocorra a degradação microbiana de hidrocarbonetos de petróleo (Naik & Duraphe, 2012, Thapa *et al.*, 2012), visto que é um elemento limitante para o crescimento das bactérias aeróbicas (Díaz, 2004).

De maneira similar ao presente estudo, Hamzah *et al.* (2010) e Prathiba *et al.* (2014), com o objetivo de isolar bactérias eficientes para degradar diesel e petróleo, respectivamente, utilizaram a velocidade de rotação do “shaker” de 150 rpm, obtendo taxas de degradação de 95% e 77%. Segundo Deng *et al.* (2014), a rotação de 150 rpm gera uma boa aeração no meio, conservando a concentração de oxigênio dissolvido que é necessário no processo de biorremediação.

A condutividade elétrica, parâmetro utilizado para o monitoramento do consumo de nutrientes, foi, de modo geral, significativamente maior nos TB quando comparados ao controle, demonstrando a degradação do petróleo e sua utilização como fonte de carbono e energia. Houve uma tendência de elevação nos valores de condutividade nos diferentes intervalos de tempo, sendo as condutividades mínima e máxima relatadas de 1117,33 mS.cm<sup>-1</sup> (*Bacillus sp.*<sup>5</sup>) e 2556,67 mS.cm<sup>-1</sup> (*Bacillus sp.*<sup>2</sup>), respectivamente (Tabela 1).

Akpoveta *et al.* (2011) e Vincent *et al.* (2011), com o objetivo de examinar os efeitos dos hidrocarbonetos sobre as propriedades do solo, verificaram um aumento significativo da condutividade após o processo de biorremediação, corroborando com os dados do presente estudo. A condutividade elétrica é uma indicação da quantidade de íons presentes no meio (Arias *et al.*, 2005). Sua elevação indica a degradação de petróleo, visto que as bactérias consomem os hidrocarbonetos, gerando íons dissociados, o que aumenta a condutividade elétrica da solução (Atekwana *et al.*, 2004). Da mesma forma, Dong *et al.* (2013) afirmam que ácidos orgânicos e íons são gerados durante o processo de degradação, o que promove um aumento na condutividade elétrica.

Em relação à biomassa constataram-se valores superiores nos tempos T24 e T48. Este parâmetro indica que o petróleo foi utilizado como fonte de carbono, permitindo o crescimento das bactérias e o, conseqüente, aumento de biomassa. De modo geral, verificou-se uma faixa de variação de biomassa de 0,87 g.L<sup>-1</sup> a 2,67 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Tanase *et al.* (2013), avaliando o crescimento de quatro bactérias (*Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacia*) em substratos com hidrocarbonetos de petróleo como a única fonte de carbono, obtiveram fases de crescimento exponencial entre os dias 2 e 9.

A densidade óptica (DO<sub>610nm</sub>), assim como a quantificação de biomassa, permite o monitoramento do crescimento das bactérias. No presente estudo verificou-se diferença

significativa entre todos os valores de densidade de TB quando comparados ao controle, sendo o valor mínimo relatado de 0,07 e o maior valor de 0,16 (Tabela 2). De modo similar à biomassa, observou-se aumento nos valores de densidade óptica dos tempos T24 e T48. Nwinyi *et al.* (2008), estudando o potencial de *Rhodococcus* sp. em biodegradar um hidrocarboneto específico, obtiveram aumento gradativo nos valores de densidade óptica (de 0,07 a 0,08 em meio com menor concentração do contaminante e 0,13 a 0,16 com maior concentração do contaminante), em um período de 21 dias.

Vale ressaltar que o controle dos parâmetros que afetam diretamente a biorremediação são importantes para que ocorra um bom desempenho no processo de descontaminação ambiental (Boopathy, 2000), visto que, conforme Cheng & Mulla (1999), Chen *et al.* (2008) e Naik & Duraphe (2012), a biorremediação pode ser limitada se as condições físicas e químicas não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos micro-organismos degradadores.

### **Avaliação da capacidade de produção de biossurfactante**

Das sete bactérias testadas quanto à produção de biossurfactante, quatro foram classificadas como fortemente positivas e três como positivas (Tabela 3). Estes resultados demonstram que 100% das bactérias analisadas produzem biossurfactante. Pinto *et al.* (2009), com o objetivo de selecionar bactérias com capacidade de produção de biossurfactante, verificaram a potencialidade de *Corynebacterium aquaticum*, por meio da constatação da redução da tensão superficial e aumento da atividade emulsificante, com a possibilidade de sua utilização em processos de biorremediação. Hassanshahian *et al.* (2014), estudando 15 bactérias isoladas de locais contaminados, selecionaram *Corynebacterium variabile*, a qual apresentou alta atividade de emulsificação e produção de biossurfactante, sendo capaz de degradar petróleo bruto.

**Tabela 3.** Teste qualitativo da produção de biossurfactante pelas sete bactérias testadas.

Bactérias	Produção de biossurfactante <sup>a</sup>
1- <i>Bacillus</i> sp. <sup>1</sup>	(++)
2- <i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup>	(+++)
3- <i>Stenotrophomonas</i> sp.	(+++)
4- <i>Microbacterium</i> sp.	(++)
5- <i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup>	(++)
6- <i>Bacillus</i> sp. <sup>4</sup>	(+++)
7- <i>Bacillus</i> sp. <sup>5</sup>	(+++)
Controle	(-)

<sup>a</sup> fortemente positiva (+++); positiva (++); negativa (-).

A produção de biossurfactante se destaca como umas das principais propriedades das bactérias degradadoras de petróleo presentes na rizosfera de plantas fitorremediadoras (Lai *et al.*, 2009). Tratam-se de moléculas que reduzem a tensão interfacial e estabilizam a emulsão dos poluentes, aumentando, deste modo, a sua biodisponibilidade e facilitando a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Banat *et al.*, 2000; Brakstad *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2009; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011; Thapa *et al.*, 2012).

### **Avaliação da eficiência da degradação de petróleo**

Em relação à degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, as análises cromatográficas revelaram a redução de área relativas aos compostos analisados após 24 e 48 horas no tratamento com bactérias (TB) quando comparados aos respectivos controles (TC) (Tabela 4, Fig. 3, Fig. 4 e Fig. 5). Os processos não biológicos ocorrem na mesma proporção para os tratamentos inoculados e controles, quando estes são submetidos às mesmas condições, portanto a biodegradação dos compostos de petróleo é verificada por meio da redução das áreas destes compostos quando comparadas a um controle, fato destacado por Karima (1995) e Zhang *et al.* (2014).

*Bacillus* sp.<sup>1</sup> demonstrou taxa de degradação dos compostos analisados entre 4 e 70% em 24 horas e entre 18 e 72% em 48 horas. *Bacillus* sp.<sup>2</sup> apresentou taxa de degradação de 12 a 38% em 24 horas, sendo esta a menor taxa de redução para este tempo e de 2 a 82% em 48 horas. *Stenotrophomonas* sp. demonstrou uma variação de degradação entre 18 e 58% em 24 horas e em 48 horas foi a mais eficiente das bactérias, apresentando taxas de degradação entre 7 e 94% em 48 horas (Tabela 4 e Fig. 3).

**Tabela 4.** Médias  $\pm$  desvios-padrão das áreas relativas aos compostos de hidrocarbonetos de petróleo nos tratamentos com bactérias (TB) e controle (TC), seguidas por porcentagem de degradação das áreas e diferenças estatísticas. TR - Tempo de retenção; DEG - Degradação.

Pico	TR (min)	Tempo 24 horas				Tempo 48 horas				
		Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de $p$	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de $p$
<i>Bacillus</i> sp. <sup>1</sup>	1	21155,5 $\pm$ 9039,2	11061,8 $\pm$ 5995,1	44,71	0,128	3,138	18544,6 $\pm$ 7130,6	5310,5 $\pm$ 1800,6	72,36	0,005*
	2	26304,7 $\pm$ 17887,7	8533,5 $\pm$ 8839,0	67,56	0,128	3,716	18892,0 $\pm$ 7582,2	11508,3 $\pm$ 2156,7	39,08	0,093
	3	45103,5 $\pm$ 29453,3	15224,2 $\pm$ 13843,1	66,25	0,128	3,886	17200,9 $\pm$ 6685,3	7469,6 $\pm$ 4705,7	56,57	0,031*
	4	18189,3 $\pm$ 2261,0	11563,6 $\pm$ 2950,1	36,43	0,005*	4,728	10941,6 $\pm$ 5306,4	6539,5 $\pm$ 1261,1	40,23	0,379
	5	103848,9 $\pm$ 48660,8	43715,5 $\pm$ 16062,5	57,90	0,066	5,615	48944,8 $\pm$ 23632,1	34894,8 $\pm$ 3231,5	28,71	0,379
	6	62686,7 $\pm$ 32185,4	27433,9 $\pm$ 9517,6	56,24	0,128	6,486	87228,0 $\pm$ 43065,3	53504,4 $\pm$ 24462,1	38,66	0,128
	7	58352,8 $\pm$ 9290,1	40204,9 $\pm$ 11315,2	31,10	0,066	7,280	407841,7 $\pm$ 184676,7	233697,0 $\pm$ 163991,5	42,70	0,128
	8	85334,5 $\pm$ 12368,6	63050,4 $\pm$ 19595,7	26,11	0,066	8,856	169361,3 $\pm$ 80652,8	138555,6 $\pm$ 18187,4	18,19	0,689
	9	204111,1 $\pm$ 134082,4	68720,8 $\pm$ 53576,5	66,23	0,128	10,347	256431,7 $\pm$ 137200,5	187493,2 $\pm$ 47228,2	26,88	0,575
	10	182341,8 $\pm$ 38733,8	104837,1 $\pm$ 29520,2	42,51	0,008*	11,219	567568,2 $\pm$ 278594,0	364281,7 $\pm$ 176888,4	35,82	0,230
	11	92648,6 $\pm$ 17875,3	75342,4 $\pm$ 31121,5	18,68	0,379	12,707	302322,5 $\pm$ 151065,2	192794,6 $\pm$ 96444,7	36,23	0,298
	12	203281,9 $\pm$ 36404,2	196007,9 $\pm$ 93411,2	3,58	0,936	13,211	124495,6 $\pm$ 69859,3	68808,3 $\pm$ 30754,4	44,73	0,230
	13	298280,3 $\pm$ 183604,3	99428,8 $\pm$ 68895,0	66,67	0,045*	14,094	109847,4 $\pm$ 58128,0	70601,3 $\pm$ 29696,	35,73	0,230
	14	265115,7 $\pm$ 177397,5	80373,2 $\pm$ 66666,6	69,68	0,045*	15,189	281405,3 $\pm$ 171864,8	201081,7 $\pm$ 69918,0	28,54	0,575
	15	168458,6 $\pm$ 63207,1	90552,5 $\pm$ 26878,0	46,25	0,005*	17,666	215802,7 $\pm$ 79889,1	166760,- $\pm$ 38079,7	22,73	0,575
<i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup>	1	5425,1 $\pm$ 334,6	4661,5 $\pm$ 738,8	14,07	0,128	4,142	16196,2 $\pm$ 6805,4	2967,7 $\pm$ 1212,5	81,68	0,005*
	2	19550,5 $\pm$ 1709,1	17031,6 $\pm$ 4196,0	12,88	0,379	5,175	8759,3 $\pm$ 983,8	3554,1 $\pm$ 1250,3	59,42	0,005*
	3	45162,7 $\pm$ 3191,0	39814,9 $\pm$ 8168,7	11,84	0,379	5,505	34327,9 $\pm$ 6207,7	14630,0 $\pm$ 3703,4	57,38	0,005*
	4	59268,2 $\pm$ 6712,6	46513,6 $\pm$ 20326,6	21,52	0,230	6,575	23193,1 $\pm$ 5448,1	22688,4 $\pm$ 5167,8	2,18	0,688
	5	41466,9 $\pm$ 3778,7	35079,0 $\pm$ 7765,6	15,40	0,230	6,849	24403,1 $\pm$ 6256,6	19882,9 $\pm$ 4096,2	18,52	0,229
	6	39728,3 $\pm$ 4478,3	33334,9 $\pm$ 7479,5	16,09	0,174	7,426	87740,2 $\pm$ 25281,3	37869,3 $\pm$ 9545,5	56,84	0,005*
	7	102743,2 $\pm$ 12153,3	86986,1 $\pm$ 16487,3	15,34	0,066	7,816	49664,9 $\pm$ 14439,2	19757,8 $\pm$ 5094,2	60,22	0,005*

\*Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).



Tabela 4. Continuação.

	Pico	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	
	Tempo 24 horas						Tempo 48 horas					
<i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup>	8	10,902	135795,7±16133,8	87557,9±19049,8	35,52	0,005*	8,309	56071,1±19645,4	39254,5±13118,7	29,99	0,378	
	9	11,637	129434,5±15003,1	112840,3±24109,9	12,82	0,298	8,622	126512,7±43161,6	54793,6±24506,7	56,69	0,008*	
	10	12,372	50817,5±13350,9	35774,2±7411,8	29,60	0,020*	8,914	37272,1±13880,7	34717,8±7615,2	6,85	0,575	
	11	12,547	56073,2±8779,1	47869,1±14076,0	14,63	0,298	10,337	146966,7±53043,7	77609,9±16205,4	47,19	0,005*	
	12	15,006	107584,4±13019,7	66959,4±29481,4	37,76	0,066	14,637	123112,3±62063,5	53992,0±18630,0	56,14	0,065	
	13	15,326	92436,8±45211,2	67866,1±54948,9	26,58	0,379	15,656	73317,7±31342,1	64473,5±32903,6	12,06	0,470	
	14	15,797	127856,9±17444,2	99893,9±20193,0	21,87	0,020*	18,955	137533,3±51639,1	54383,3±17319,0	60,46	0,020*	
	15	22,015	81849,8±46601,3	56214,4±12348,2	31,32	0,810	21,369	139920,4±35260,2	66409,8±40463,5	52,54	0,020*	
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1	2,985	22089,5±2699,0	14621,7±8711,5	33,81	0,229	4,537	88558,2±8321,9	5637,9±1312,1	93,63	0,005*	
	2	3,885	26500,4±4113,2	13388,6±12623,3	49,48	0,128	5,495	47727,0±7563,9	11675,7±4990,8	75,54	0,005*	
	3	5,506	64538,4±17115,7	32919,1±34811,1	48,99	0,128	8,086	46540,4±8824,0	29576,6±13434,0	36,45	0,045*	
	4	6,006	30352,6±7853,7	21253,7±8739,4	29,98	0,128	11,167	193457,2±40927,4	70873,9±29314,7	63,36	0,005*	
	5	7,423	101356,7±21387,7	72731,6±45456,6	28,24	0,297	11,831	63048,9±18167,1	43127,3±14523,1	31,60	0,174	
	6	9,172	99900,0±23773,5	64423,1±39513,6	35,51	0,128	11,921	160971,3±35681,9	66268,5±37511,7	58,83	0,008*	
	7	11,641	121816,9±31751,0	73212,4±50634,1	39,90	0,128	12,488	85954,3±22768,3	32575,4±9406,4	62,10	0,005*	
	8	13,949	49713,0±11644,9	34682,7±13248,7	30,23	0,378	12,706	150781,6±35482,8	37402,7±12864,5	75,19	0,005*	
	9	14,357	192973,0±43687,4	81594,2±91917,6	57,72	0,128	13,764	33923,1±11093,1	31425,6±10551,5	7,36	0,936	
	10	14,687	85621,9±21365,8	69200,6±57166,2	19,18	0,810	14,094	51557,7±13890,3	19699,6±6235,4	61,79	0,005*	
	11	16,851	119187,2±24349,1	73074,2±42778,1	38,69	0,030*	14,682	171319,8±21564,4	123722,6±64626,4	27,78	0,066	
	12	19,869	92932,6±16794,6	76706,5±47960,8	17,46	0,575	15,015	72270,6±24560,2	46018,8±21788,1	36,32	0,471	
	13	20,417	259508,7±49321,3	142118,4±14771,4	45,24	0,229	16,016	126625,5±30931,77	30938,3±8965,2	75,57	0,005*	
	14	23,983	77445,4±31821,7	35067,2±29173,5	54,72	0,092	16,658	78670,1±12422,4	70793,0±17510,5	10,01	0,810	
	15	26,092	38200,4±11770,8	19756,7±17656,6	48,28	0,128	21,542	108770,6±19133,2	88259,8±24376,4	18,86	0,128	

\*Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 4. Continuação.

Pico	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	
Tempo 24 horas						Tempo 48 horas					
<i>Microbacterium</i> sp.	1	5,248	25264,5±17357,4	4270,4±1085,8	83,10	0,031*	5,689	56408,1±10751,5	23796,4±16357,9	57,81	0,005*
	2	5,692	43358,4±20115,1	36281,5±9180,3	16,32	0,379	7,659	116895,8±10128,0	52113,8±28928,2	55,42	0,005*
	3	6,847	18709,4±5976,0	13636,7±3427,9	27,11	0,174	8,290	93713,4±8087,5	19669,0±8839,9	79,01	0,005*
	4	7,561	124779,9±98425,0	62863,0±17027,9	49,62	0,575	9,689	121657,0±12837,4	57642,3±27729,5	52,62	0,005*
	5	9,770	99764,7±55323,1	55174,9±16562,4	44,69	0,128	10,808	106933,6±10908,0	24492,8±13328,2	77,10	0,005*
	6	10,745	139835,7±87557,6	43535,5±14294,8	68,87	0,005*	11,580	82719,9±7767,4	30804,8±15416,0	62,76	0,005*
	7	11,711	35594,8±8418,9	23967,3±7965,9	32,67	0,093	11,856	170468,7±12843,1	46904,6±25375,7	72,48	0,005*
	8	12,530	20642,7±9173,6	20041,7±6800,9	2,91	0,936	12,315	33287,0±4091,7	21002,8±11995,2	36,90	0,066
	9	13,055	70086,6±45156,1	30279,3±12281,2	56,80	0,031*	12,655	215642,0±22696,0	50899,7±26277,2	76,40	0,005*
	10	14,752	43730,2±9084,1	13849,0±6745,3	68,33	0,005*	13,052	53368,2±14544,7	28519,3±16452,3	46,56	0,020*
	11	14,877	46493,2±16479,0	39321,7±18190,3	15,42	0,379	13,383	40653,9±13476,0	32057,3±18664,9	21,15	0,298
	12	16,352	66000,6±24922,9	35302,5±16276,8	46,51	0,045*	14,337	151982,9±21305,2	36683,5±20635,9	75,86	0,005*
	13	16,529	63196,1±6,150,0	37321,4±16056,8	40,94	0,008*	16,414	53212,6±12936,6	27641,6±16986,8	48,05	0,031*
	14	16,706	71650,9±14164,9	31231,8±13980,3	56,41	0,005*	17,082	77053,5±13767,2	42131,8±23450,5	45,32	0,013*
	15	17,249	70666,5±30004,1	64126,5±17622,0	9,25	0,810	18,130	144313,0±24583,7	81756,0±41328,2	43,35	0,013*
<i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup>	1	6,012	59175,2±5174,7	27027,6±13795,3	54,33	0,379	4,087	9350,6±3657,1	6593,2±2360,1	29,49	0,093
	2	6,564	68309,2±4269,2	30123,8±15827,2	55,90	0,298	5,170	7944,7±6694,7	2873,9±901,6	63,83	0,230
	3	7,042	38343,9±39076,5	15892,7±9093,1	58,55	0,298	6,329	32266,1±13818,4	11575,6±3883,5	64,12	0,008*
	4	7,207	95444,0±3076,0	44489,1±23739,8	53,39	0,379	7,979	143427,4±78879,4	45650,5±13640,7	68,17	0,020*
	5	7,281	458376,6±35155,8	273555,9±14131,8	40,32	0,810	8,068	140706,6±46255,5	54816,9±29281,7	61,04	0,008*
	6	7,979	305144,6±18878,0	150437,5±82167,0	50,70	0,379	8,398	70473,8±51213,1	47486,5±14838,9	32,62	0,689
	7	8,082	115012,8±121298,1	54303,4±30888,8	52,78	0,379	8,531	184678,6±125133,2	51601,6±16302,2	72,06	0,005*

\*Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 4. Continuação.

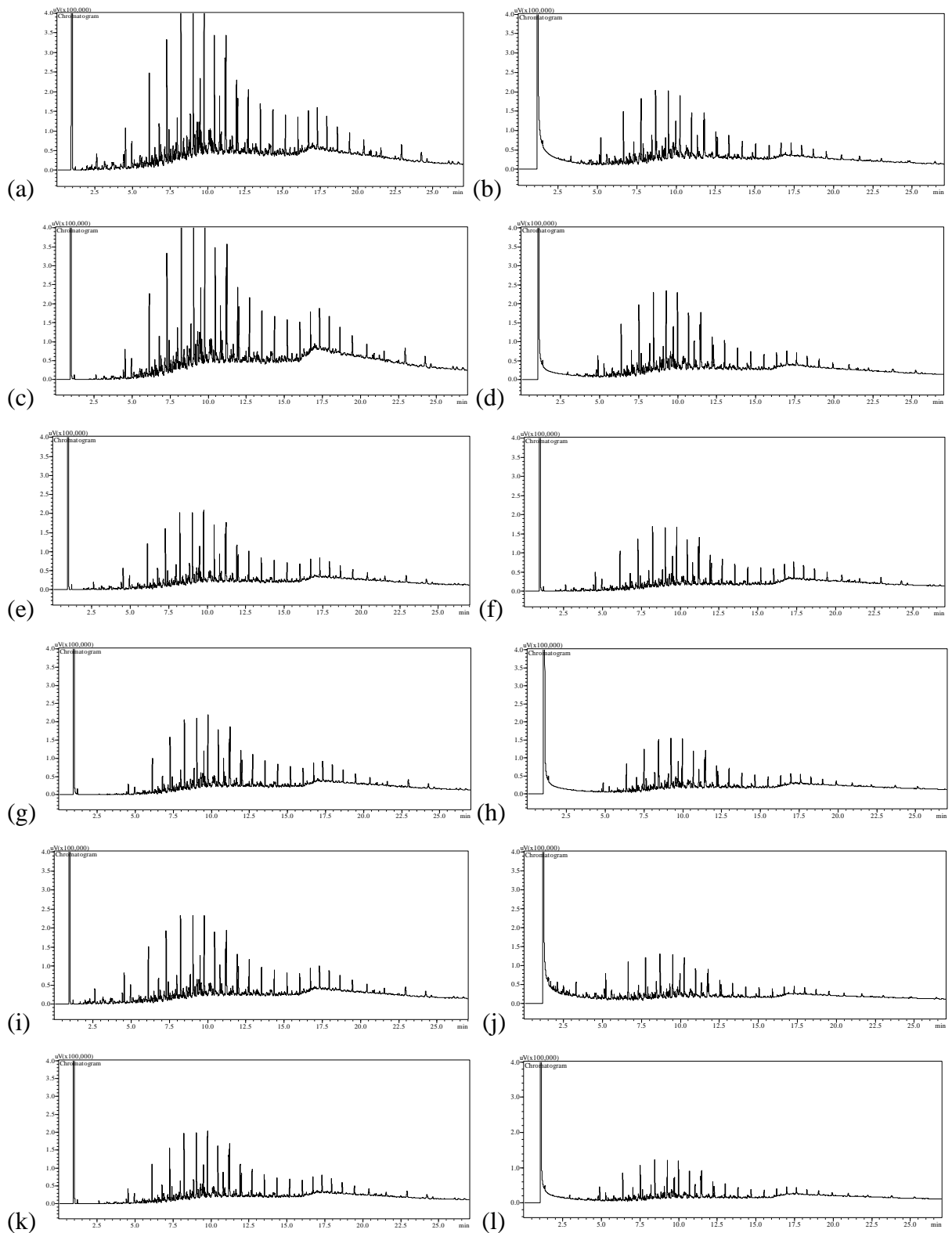
	Pico	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	TR (min)	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	
	Tempo 24 horas						Tempo 48 horas					
<i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup>	8	8,395	167915,5±13522,3	83057,7±47065,2	50,54	0,379	8,704	116370,2±37221,3	47022,2±23494,2	59,59	0,008*	
	9	8,448	139479,0±144685,9	64354,6±37027,7	53,86	0,379	9,575	298141,9±196397,3	190431,6±58527,6	36,13	0,471	
	10	8,523	193042,3±126740,2	65080,0±38519,7	66,29	0,031*	11,436	188085,3±125883,3	69065,8±21585,5	63,28	0,031*	
	11	8,706	89722,1±93669,3	39056,3±23442,2	56,47	0,379	11,531	91924,0±52929,3	50879,9±17487,6	44,65	0,093	
	12	8,915	93435,7±88371,6	35802,5±21121,0	61,68	0,066	12,244	81057,3±43419,1	34579,3±11848,0	57,34	0,032*	
	13	10,594	133513,5±152971,9	63505,9±39879,7	52,43	0,379	15,829	50323,3±29619,7	38524,8±16734,3	23,45	0,379	
	14	11,543	123463,9±97115,5	42137,6±26750,3	65,87	0,020*	17,047	93758,2±45287,9	82952,7±17086,9	11,52	0,689	
	15	14,064	97019,5±81135,7	82279,3±55800,8	15,19	0,810	17,632	148554,0±35705,3	138412,1±43757,5	6,83	0,810	
<i>Bacillus</i> sp. <sup>4</sup>	1	2,436	9237,3±6156,0	4548,6±1962,9	50,76	0,230	4,275	11193,3±1579,5	4255,2±24364	61,98	0,005*	
	2	2,873	16234,2±2238,4	13688,6±4551,7	15,68	0,471	4,941	75468,9±6761,1	6614,0±3778,9	91,24	0,005*	
	3	5,940	21993,8±10363,5	11864,6±1905,2	69,93	0,379	5,843	45233,1±3154,4	11923,2±6874,3	73,64	0,005*	
	4	7,123	36317,0±18041,3	31578,2±6000,9	13,05	0,471	6,703	93146,2±65484,1	15518,2±994,9	83,34	0,379	
	5	9,900	172134,3±11172,3	126599,4±61079,0	26,45	0,689	7,175	51178,0±3913,8	16864,5±2992,7	67,05	0,005*	
	6	10,974	102461,7±22106,8	57070,0±17503,3	44,30	0,013*	7,783	110309,3±31284,6	28711,0±2159,8	73,97	0,005*	
	7	11,879	190955,9±128133,3	109308,2±89876,3	42,76	0,575	7,965	85183,2±6163,4	52220,6±27652,4	38,70	0,005*	
	8	12,177	64058,1±43042,9	60680,9±12124,2	5,27	0,936	8,363	39742,9±6424,5	34092,4±3667,3	14,22	0,093	
	9	13,339	57613,9±24003,3	37614,6±9065,7	34,71	0,230	8,439	54108,6±24608,6	31746,0±3079,6	41,33	0,013*	
	10	14,000	37248,9±20314,3	36361,2±7246,3	2,38	0,936	8,643	77146,7±65077,8	30681,9±4710,4	60,23	0,031*	
	11	14,423	34662,5±18068,0	20461,4±8782,8	40,97	0,128	9,587	187189,3±100683,1	160200,0±9016,6	14,42	0,379	
	12	14,567	35824,2±12074,2	31102,7±13106,4	13,18	0,689	9,902	147872,4±87149,9	81321,3±6863,3	45,01	0,379	
	13	15,170	89808,3±67258,5	53317,1±36911,2	40,63	0,379	15,169	77231,4±47226,5	32040,5±4709,2	58,51	0,379	
	14	16,387	93924,3±47635,4	47744,2±17743,6	49,17	0,230	17,169	46845,9±4500,5	43681,0±2441,3	6,76	0,128	
	15	16,881	56391,9±25550,6	53723,5±14799,5	4,73	0,936	17,414	142049,2±69229,5	81302,8±10909,6	42,76	0,174	

\*Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Continuação.

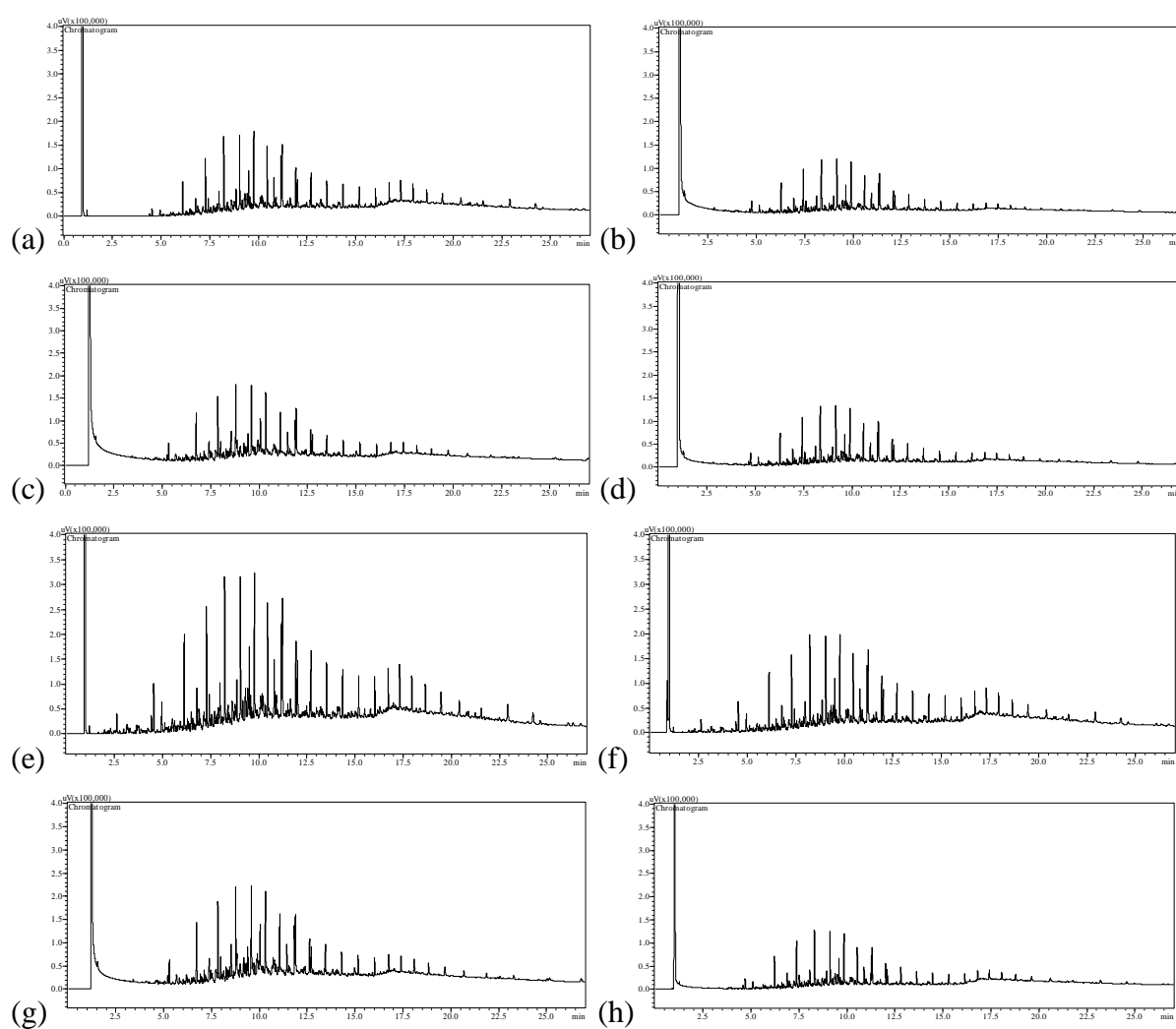
Pico	TR	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	TR	Área TC	Área TB	DEG (%)	Valor de <i>p</i>	
	(min)					(min)					
Tempo 24 horas						Tempo 48 horas					
<i>Bacillus</i> sp. <sup>5</sup>	1	4,538	132188,6±21822,2	81087,3±52455,9	38,66	0,093	3,293	13472,1±15847,5	6901,1±4756,3	48,77	0,810
	2	5,041	8839,0±1773,1	5265,4±2258,4	40,43	0,008*	3,752	7352,2±3658,2	6631,4±3812,8	9,80	0,810
	3	6,280	30349,7±7085,1	25935,7±4452,5	14,54	0,230	5,110	20355,7±14610,7	14424,0±7180,0	29,14	0,936
	4	7,023	17899,8±4575,8	13297,4±3256,3	25,71	0,230	5,998	18301,9±4299,3	17798,9±5037,0	2,75	0,936
	5	8,745	55807,0±14190,0	43075,4±2610,3	22,81	0,013*	6,837	30955,8±10869,6	27117,1±2278,8	12,40	0,936
	6	9,168	110886,1±28095,6	70652,2±27235,6	36,28	0,066	7,753	89233,7±103232,7	87551,1±104021,9	1,89	0,936
	7	10,801	246150,8±59773,4	146939,7±74282,7	40,30	0,066	8,044	35833,1±16145,9	31061,1±12418,7	13,32	0,810
	8	11,166	254187,1±57978,9	149201,8±90934,0	41,30	0,066	8,745	72743,0±35656,7	68698,8±36487,6	5,56	0,575
	9	12,406	57400,9±18449,2	46548,4±15408,7	18,91	0,128	10,338	115695,2±50459,6	115090,5±60777,2	0,52	0,575
	10	13,622	63895,9±17488,2	47634,3±5034,2	25,45	0,045*	10,955	131873,4±47729,7	128494,9±41740,8	2,56	0,936
	11	14,152	92372,2±23885,4	55407,7±28861,6	40,02	0,013*	11,339	116848,6±44160,9	115552,3±38501,8	1,11	0,810
	12	15,011	118402,7±29680,2	67066,6±21024,3	43,36	0,013*	11,633	101941,7±40921,8	98532,8±33728,8	3,34	0,936
	13	16,017	172864,0±43474,3	103346,5±56857,0	40,22	0,045*	11,777	92755,8±68498,0	55341,9±13804,1	40,34	0,174
	14	19,753	124791,6±48716,3	94358,1±12766,2	24,39	0,298	13,758	41635,4±9006,5	39186,1±5148,3	5,88	0,936
	15	20,883	152250,5±45672,1	101989,1±36460,6	33,01	0,174	15,236	57121,9±20335,4	55081,8±19042,1	3,57	0,936

\*Diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

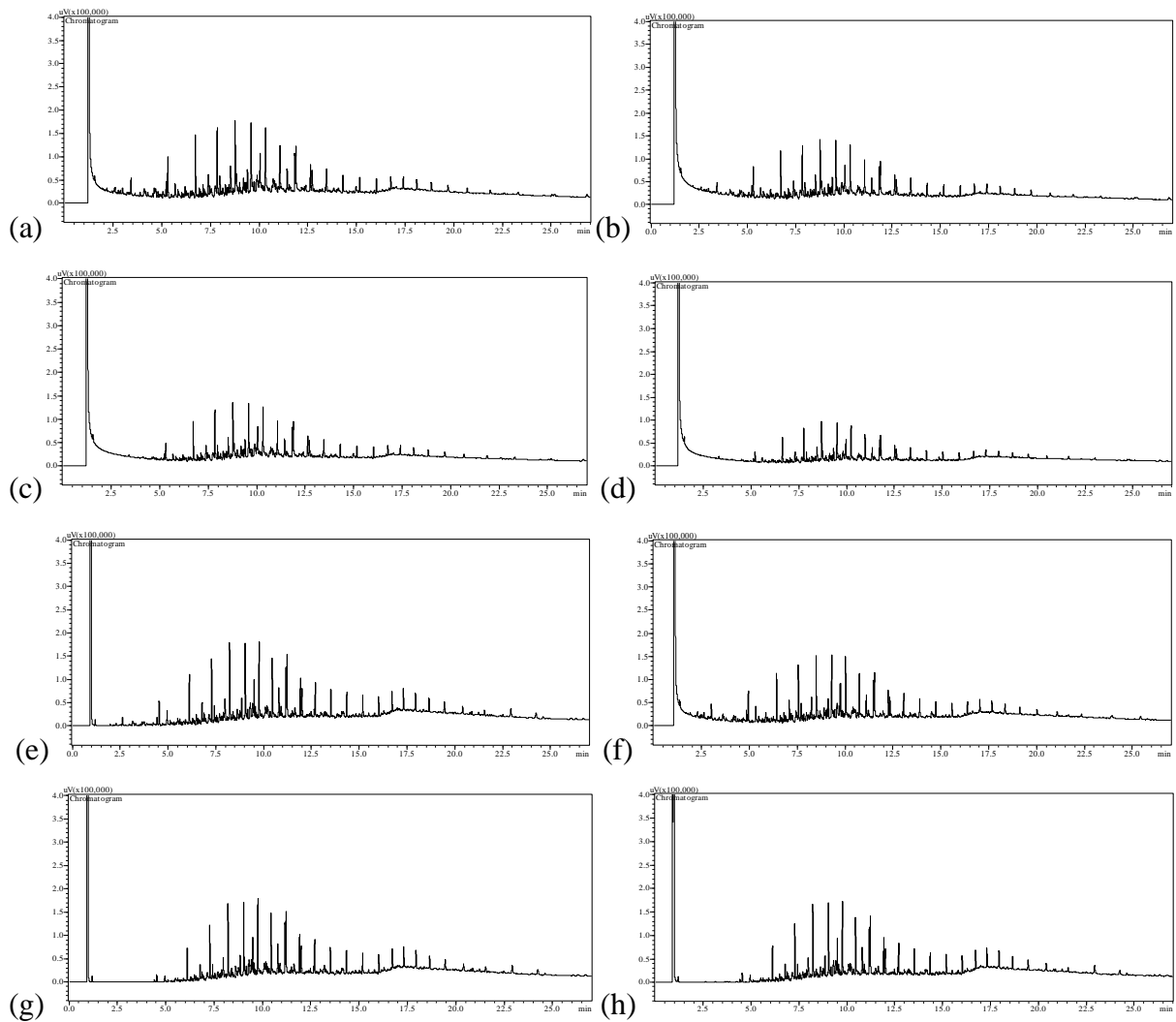


**Fig. 3.** Cromatogramas referentes à degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (b) T24 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (c) C48 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (d) T48 - *Bacillus* sp.<sup>1</sup>; (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (f) T24 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (h) T48 - *Bacillus* sp.<sup>2</sup>; (i) C24 - *Stenotrophomonas* sp.; (j) T24 - *Stenotrophomonas* sp.; (k) C48 - *Stenotrophomonas* sp.; (l) T48 - *Stenotrophomonas* sp.

Em relação à *Microbacterium* sp. observou-se taxa de degradação dos compostos de 3 a 83% em 24 horas, sendo esta a bactéria mais eficiente na degradação de compostos neste tempo, e de 21 a 79% em 48 horas. A taxa de degradação dos compostos por *Bacillus* sp.<sup>3</sup> foi entre 25 e 66% em 24 horas e entre 7 e 72% em 48 horas (Tabela 4 e Fig. 4). Já *Bacillus* sp.<sup>4</sup> apresentou uma variação de degradação de 2 a 70% em 24 horas e de 7 a 91% em 48 horas. Por fim, *Bacillus* sp.<sup>5</sup> demonstrou uma taxa de degradação dos compostos analisados entre 14 e 43% em 24 horas e em 48 horas foi a bactéria com as menores taxas de degradação, relatadas entre 0,52 e 49% (Tabela 4 e Fig. 5)



**Fig. 4.** Cromatogramas referentes à degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Microbacterium* sp.; (b) T24 - *Microbacterium* sp.; (c) C48 - *Microbacterium* sp.; (d) T48 - *Microbacterium* sp.; (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (f) T24 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>; (h) T48 - *Bacillus* sp.<sup>3</sup>.



**Fig. 5.** Cromatogramas referentes à degradação dos compostos de petróleo pelas bactérias, em que a área está em função do tempo de retenção. (a) C24 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (b) T24 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (c) C48 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (d) T48 - *Bacillus* sp.<sup>4</sup>; (e) C24 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (f) T24 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (g) C48 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>; (h) T48 - *Bacillus* sp.<sup>5</sup>.

Dos compostos analisados, em relação aos tempos 24 e 48 horas de todas as bactérias, 26,25% e 50,40%, respectivamente, apresentaram valor de  $p \leq 0,05$ , indicando redução significativa da área dos compostos nos tratamentos com bactérias quando comparados aos respectivos controles. Além disso, de maneira geral, as taxas de degradação de hidrocarbonetos pelas bactérias analisadas variavam de 11,84% (*Bacillus* sp.<sup>2</sup>) a 83,10% (*Microbacterium* sp.) em 24 horas e de 0,52% (*Bacillus* sp.<sup>5</sup>) a 93,63% (*Stenotrophomonas* sp.) em 48 horas.

Al-Wasify & Hamed (2014) verificaram taxas de degradação de compostos de petróleo de 77,8% por *Pseudomonas aeruginosa*, 76,7% por *Bacillus subtilis* e 74,3% por *Acinetobacter lwoffii*, em um período de 28 dias de incubação. Roy *et al.* (2002) constataram taxas de

degradação de 47% a 78% de petróleo bruto em 20 dias, por *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp. e *Nocardia* sp. Liu *et al.* (2014) relataram que *Acinetobacter* sp. pode utilizar óleo bruto como a única fonte de carbono, proporcionando uma degradação de 70,3% em sete dias. Já Hassanshahian *et al.* (2014) constataram a capacidade de *Corynebacterium variabile* em degradar 82% dos compostos de petróleo bruto, sobretudo alcanos, também em sete dias. Diante deste fato, cabe ressaltar a importância dos resultados do presente estudo, visto que, as altas taxas de degradação de hidrocarbonetos de petróleo foram relatadas em um curto período de tempo quando comparados a outros estudos.

### **Correlação dos parâmetros analisados**

As correlações entre as principais variáveis que contribuem para o processo de biorremediação dos hidrocarbonetos de petróleo, pelas bactérias analisadas, podem ser visualizadas na Tabela 5. Constatou-se que, para as sete bactérias, a correlação entre CE x OD variou entre negativa regular ( $r = -0,50$ ) e negativa perfeita ( $r = -1,00$ ) nos tempos T24 e T48 horas, o que demonstra que tais parâmetros são inversamente proporcionais (Tabela 5). Deste modo, para que a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo aconteça, o OD é utilizado no metabolismo bacteriano (Naik & Duraphe, 2012; Thapa *et al.*, 2012) e este processo de degradação gera ácidos orgânicos e íons, que promovem um aumento na CE do meio (Atekwana *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2013).

Para os parâmetros BIO x CE houve variação de correlação nula ( $r = 0,00$ ) a positiva perfeita ( $r = 1,00$ ) no tempo T48 horas, sendo a primeira relatada apenas para *Bacillus* sp.<sup>3</sup> (Tabela 5). Isto demonstra que conforme ocorre a biodegradação dos hidrocarbonetos, a CE aumenta (Dong *et al.*, 2013) e a BIO também, devido à utilização dos hidrocarbonetos pelos micro-organismos como fonte de energia e consequente crescimento microbiano (McCutcheon & Schonoor, 2003). Zhang *et al.* (2010) também citam que existe uma correlação positiva entre a biodegradação de petróleo e a produção de biomassa bacteriana.

Em relação aos parâmetros DO x OD verificaram-se correlações variando de nula ( $r = 0,00$ ) a negativa forte ( $r = -0,87$ ), sobretudo, para o tempo T24 horas, sendo a primeira apenas relatada para *Bacillus* sp.<sup>2</sup>. Estes resultados demonstram que tais variáveis, ao se correlacionarem negativamente, indicam que está ocorrendo a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 5), visto que, durante o processo de degradação, o oxigênio é consumido e o carbono é utilizado para o crescimento microbiano (McCutcheon & Schonoor, 2003;



Mendes *et al.*, 2013; Prashar *et al.*, 2014). Deste modo, os valores de DO aumentam e os de OD reduzem, conforme a degradação ocorre.

**Tabela 5.** Valores de r dos parâmetros pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), biomassa (BIO) e densidade óptica (DO) para a avaliação de suas interações durante o processo de biorremediação por meio da Correlação de Spearman.

	Correlações	T0 horas	T24 horas	T48 horas	T72 horas
<i>Bacillus</i> sp. <sup>1</sup> .	pH X T	1,00 <sup>k</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	OD X pH	-0,50 <sup>b</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	OD X T	-0,50 <sup>b</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	CE X pH	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X T	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X OD	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X pH	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	BIO X T	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X OD	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	BIO X CE	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	DO X pH	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X T	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	DO X OD	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X CE	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>
DO X BIO	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	
<i>Bacillus</i> sp. <sup>2</sup> .	pH X T	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	OD X pH	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	OD X T	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X pH	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X T	1,00 <sup>k</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X OD	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	BIO X pH	0,50 <sup>h</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	BIO X T	-1,00 <sup>e</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	BIO X OD	-0,50 <sup>b</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	BIO X CE	-1,00 <sup>e</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X pH	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	DO X T	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	DO X OD	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	DO X CE	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
DO X BIO	-0,87 <sup>c</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,87 <sup>i</sup>	
	pH X T	1,00 <sup>k</sup>	1,00 <sup>k</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	OD X pH	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	OD X T	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X pH	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X T	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-1,00 <sup>e</sup>

Letras representam: a- correlação negativa fraca; b-negativa regular; c- negativa forte; d- negativa muito forte; e- negativa perfeita; f- nula; g- positiva fraca; h- positiva regular; i- positiva forte; j- positiva muito forte; k- positiva perfeita (Callegari-Jacques, 2003).

Tabela 5. Continuação.

	Correlações	T0 horas	T24 horas	T48 horas	T72 horas
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	CE X OD	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X pH	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X T	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X OD	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	BIO X CE	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	DO X pH	1,00 <sup>k</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	DO X T	1,00 <sup>k</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	DO X OD	0,50 <sup>h</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	DO X CE	1,00 <sup>k</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	DO X BIO	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
<i>Microbacterium</i> sp.	pH X T	-0,87 <sup>c</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	OD X pH	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	OD X T	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	CE X pH	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	CE X T	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X OD	-1,00 <sup>e</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X pH	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	BIO X T	0,50 <sup>h</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	BIO X OD	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	BIO X CE	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X pH	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X T	-1,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	DO X OD	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	DO X CE	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
DO X BIO	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	
<i>Bacillus</i> sp. <sup>3</sup> .	pH X T	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	OD X pH	1,00 <sup>k</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	OD X T	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X pH	-0,50 <sup>b</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	CE X T	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X OD	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X pH	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	BIO X T	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	BIO X OD	-1,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	BIO X CE	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	DO X pH	0,50 <sup>h</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	DO X T	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X OD	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	DO X CE	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>
DO X BIO	-0,50 <sup>b</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,50 <sup>h</sup>	

Letras representam: a- correlação negativa fraca; b-negativa regular; c- negativa forte; d- negativa muito forte; e- negativa perfeita; f- nula; g- positiva fraca; h- positiva regular; i- positiva forte; j- positiva muito forte; k- positiva perfeita (Callegari-Jacques, 2003).

**Tabela 5.** Continuação.

	Correlações	T0 horas	T24 horas	T48 horas	T72 horas
<i>Bacillus</i> sp. <sup>4</sup> .	pH X T	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	OD X pH	-0,50 <sup>b</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	OD X T	-1,00 <sup>e</sup>	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X pH	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	CE X T	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X OD	1,00 <sup>k</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	BIO X pH	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	BIO X T	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	BIO X OD	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	BIO X CE	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,00 <sup>f</sup>
	DO X pH	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	DO X T	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	DO X OD	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	DO X CE	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	DO X BIO	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,00 <sup>f</sup>
<i>Bacillus</i> sp. <sup>5</sup> .	pH X T	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	OD X pH	0,50 <sup>h</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	OD X T	-1,00 <sup>e</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	CE X pH	-1,00 <sup>e</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>
	CE X T	0,50 <sup>h</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	CE X OD	-0,50 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	BIO X pH	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,50 <sup>h</sup>
	BIO X T	-0,87 <sup>c</sup>	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	BIO X OD	0,87 <sup>i</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-1,00 <sup>e</sup>	1,00 <sup>k</sup>
	BIO X CE	0,00 <sup>f</sup>	0,00 <sup>f</sup>	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>
	DO X pH	0,00 <sup>f</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	DO X T	-0,87 <sup>c</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X OD	0,87 <sup>i</sup>	-0,87 <sup>c</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>
	DO X CE	0,00 <sup>f</sup>	0,87 <sup>i</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,87 <sup>c</sup>
	DO X BIO	1,00 <sup>k</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	0,50 <sup>h</sup>	0,87 <sup>i</sup>

Letras representam: a- correlação negativa fraca; b-negativa regular; c- negativa forte; d- negativa muito forte; e- negativa perfeita; f- nula; g- positiva fraca; h- positiva regular; i- positiva forte; j- positiva muito forte; k- positiva perfeita (Callegari-Jacques, 2003).

Por fim, para os parâmetros DO x BIO constataram-se correlações variando de nulas ( $r = 0,00$ ) a positivas fortes ( $r = 0,87$ ), sobretudo para o tempo T48 horas, demonstrando que tais variáveis ao se correlacionarem, indicam que está ocorrendo o processo de degradação de petróleo no tempo analisado (Tabela 5).

Diante de tais resultados, cabe ressaltar que a correlação entre os parâmetros analisados (biomassa x condutividade elétrica, densidade óptica x oxigênio dissolvido e densidade óptica x biomassa) se torna importante para o monitoramento do processo de degradação dos

hidrocarbonetos de petróleo, visto que estas variáveis indicam a redução destes compostos. Além disso, ao constatar-se o crescimento de micro-organismos em ambientes contaminados com petróleo (por meio do aumento da biomassa microbiana e densidade óptica), pode-se afirmar que estes são degradadores, visto que se desenvolveram no meio utilizando o carbono como fonte de energia, fato também defendido por Prashar *et al.* (2014).

## Conclusões

As sete bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras, *Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup> e *Bacillus* sp.<sup>5</sup>, demonstraram-se tolerantes e eficientes quanto à degradação de petróleo, visto que se desenvolveram em um meio em que o petróleo foi utilizado como única fonte de carbono e energia.

Os parâmetros CE, OD, BIO e DO são as principais variáveis que indicam a ocorrência do processo de degradação e devem ser considerados e analisados com o intuito de selecionar bactérias com capacidade de degradar petróleo.

A eficiência para a degradação foi comprovada pela redução das áreas relativas aos compostos de petróleo para todas as bactérias, entretanto, observou-se que *Microbacterium* sp. e *Stenotrophomonas* sp., respectivamente, apresentaram-se como mais eficientes para a degradação dos compostos de petróleo em 24 e 48 horas. Além disso, estas sete bactérias também são capazes de produzir biosurfactante, moléculas que auxiliam durante a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo.

Os resultados obtidos podem auxiliar no desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas de biorremediação, uma vez que estas bactérias são altamente eficientes e podem ser utilizadas, isoladas ou também associadas em consórcios bacterianos, para o tratamento de áreas contaminadas com petróleo.

## Referências

Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE & Ehinomen I (2015) Biorremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Int J Environ Bioremediat Biodegradation* **3**: 28-39.

Akpoveta OV, Egharevba F & Medjor OW (2011) A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *Inter Journal Environ Sci* **2**: 54-67.

Al-Wasify R & Hamed SR (2014) Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *Inter J Bacteriol* **2014**: 1-8.

Ali H, Khan E & Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. *Chemosphere* **91**: 869-881.

Andrade JA, Augusto F & Jardim ICSF (2010) Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét Quím* **35**: 17-43.

Arias ME, González-Pérez JA, González-Vila FJ & Ball AS (2005) Soil health - a new challenge for microbiologists and chemists. *Int Microbiol* **8**: 13-21.

Atagana HI, Haynes RJ & Wallis FM (2003) Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* **14**: 297-307.

Atekwana EA, Werkema DD, Duris JW, Rossbach S, Atekwana EA, Sauck WA, Cassidy DP, Means J & Legall FD (2004) In-situ apparent conductivity measurements and microbial population distribution at a hydrocarbon-contaminated site. *Geophysics* **69**: 56-63.

Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K & Ignacimuthu S (2012) Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour Technol* **112**: 83-90.

Banat IM, Makkar RS & Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 495-508.

Bento FM, Camargo FAO, Okeke B & Frankenberger-Júnior WT (2003) Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz J Microbiol* **34**: 65-68.

Boopathy R (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour Technol* **74**: 63-67.

Caldwell DR (2000) *Microbial physiology and metabolism*. 2.ed. Belmont: Star, 2000. 403p.

Callegari-Jacques SM (2003) *Bioestatística: Princípios e Aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 255p.

Chen HJ, Guo GL, Tseng DH, Cheng CL & Huang SL (2006) Growth factors, kinetics and biodegradation mechanism associated with *Pseudomonas nitroreducens* TX1 grown on octylphenol polyethoxylates. *J Environ Manage* **80**: 79-286.

Chen J, Wong MH, Wong YS & Tam NFY (2008) Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Mar Pollut Bull* **57**: 695-702.

Cheng HH & Mulla DJ (1999) The soil environment. In: Adriano DC. *Bioremediation of contaminated soils*. Madison: ASA/CSSA/SSSA. Cap 1, 1-13.

Coutinho HD & Barbosa AR (2007) Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. *Silva Lusit* **15**: 103-117.

Cunningham SD, Anderson TA & Schwab AP (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv Agron* **56**: 55-114.

Dantas JS, Souza AP, Farias MF & Nogueira VFB (2009) Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. *PA&T* **2**: 213-218.

Das N & Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* **2011**: 1-13.

Deon MC, DeRossi A, Dal'Magro C, Reinehr CO & Colla LM (2012) Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. *Semina: Tech Ex* **33**: 73-82.

Deng M, Li J, Liang F, Meisheng Y, Xu X, Yuang J, Peng J, Wu C & Wang J (2014) Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Mar Pollut Bull* **83**: 79-86.

Déziel E, Paquette G, Villemur G, Lépine F & Bisailon JG (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microb* **62**: 1908-1912.

Díaz E (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* **7**: 173-180.

Dong ZY, Huang WH, Xing DF & Zhang HF (2013) Remediation of soil co-contaminated with petroleum and heavy metals by the integration of electrokinetics and biostimulation. *J Hazard Mater* **260**: 399-408.

Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 143-152.

EPA (2006) *Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons*. 1-171.

Farias V, Maranhão LT, Vasconcelos EC, Carvalho Filho MAS, Lacerda LG, Menegassi Azevedo JA, Pandey A & Soccol CR (2009) Phytodegradation Potential of *Erythrina cristagalli* L., Fabaceae, in Petroleum-Contaminated Soil. Petroleum-Contaminated Soil. *Appl Biochem Biotechnol* **157**: 10-22.

Faulwetter JL, Gagnon V, Sundberg C, Chazarenc F, Burr MD, Brisson J, Camper AK & Stein OR (2009) Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecol Eng* **35**: 987-1004.

Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alárcon A & Cañizares-Villanueva RO (2006) Procesos de biorremediación de suelo u agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol* **48**: 179-187.

Gaylarde CC, Bento FM & Kelley J (1999) Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Rev Microbiol* **30**: 1-10.

Gerhardt KE, Huang X, Glick BR & Greenberg BM (2009) Phytoremediation and rhizodegradation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci* **176**: 20-30.

Guedes CLB, Correr CJ, Lobo I & Abi-Saab OJG (2010) Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. *Semina: Tech Ex* **31**: 87-100.

Hamzah A, Rabu A, Azmy RFHR & Yussoff NA (2010) Isolation and Characterization of Bacteria Degrading Sumandak and South Angsi Oils. *Sains Malays* **39**: 161-168.

Hutchinson SL, Banks MK & Shwab AP (2001) Phytoremediation of age petroleum sluge: effect of inorganic fertilizer. *J Environ Qual* **30**: 395-403.

Ighovie ES & Ikechukwu EE (2014) Phytoremediation of crude oil contaminated soil with *Axonopus compressus* in the Niger Delta region of Nigeria. *Nat Resour* **5**: 59-67.

Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H & Trevors JT (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* **13**: 271-279.

Karima AH, Badawi AM, Fahd MI & Nour MH (1995) Enhancement of Egyptian crude oil bioremediation using bacterial mutants. *Egypt J Pet* **4**: 45-60.

Lai C, Huang YC, Wei Y & Chang J (2009) Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J Hazard Mater* **167**: 609-614.

Landmeyer JE. *Introduction to phytoremediation of contaminated groundwater: Historical foundation, hydrologic control, and contaminant remediation*. New York: Springer, 2011.

Liu H, Yao J, Yuan Z, Shang Y, Chen H, Wang F, Masakorala K, Yu C, Cai M, Blake RE & Choi MMF (2014) Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. *Inter Biodeterior Biodegradation* **87**: 52-59.

Liu Y, Hu X & Liu H (2016) Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S. *Inter Biodeterior Biodegradation* **107**: 56-61.

Liu W, Sun J, Ding L, Luo Y, Chen M & Tang C (2013) Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil by tal fescue (*Testuca arundinacea* L.). *Plant Soil* **371**: 533-542.

Lopes A & Piedade MTF (2009) Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Poaceae) em solo de várzea contaminado com petróleo de Urucu. *Acta Amaz* **39**: 583-590.

Macek T, Mackova M & Kas J (2000) Research review paper: exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv* **18**: 23-34.

Makadia TH, Adetutu EM, Simons KL, Jardine D, Sheppard PJ & Ball AS (2011) Re-use of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge. *J Environ Manage* **92**: 866-871.

Makkar RS & Cameotra SS (1998) Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biot* **20**: 48-52.

Malik ZA & Ahmed S (2012) Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *Afr J Biotechnol* **11**: 650-658.

Marín JA, Moreno JL, Hernández T & García C (2006) Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation* **17**: 251-261.

McCutcheon SC & Schnoor JL (2003) *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. John Wiley & Sons, New Jersey.

Mendes R, Garbeva P & Raaijmakers JM (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms, *FEMS Microbiol Rev* **37**: 634-663.

Merkl N, Schultze-Kraft R & Infante C (2005) Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Poll* **165**: 195-209.

Meyer DD, Beker SA, Bücken F, Peralba MCR, Frazzon APG, Osti JF, Andreazza R, Camargo FAO & Bento FM (2014) Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *Int Biodeterior Biodegradation* **95**: 356-363.

Mishra S, Sarma PM & Lal B (2004) Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosmo. *FEMS Microbiol Lett* **235**: 323-331.

Molinos-Senante M, Gómez T, Caballero R, Hernández-Sancho F & Sala-Garrido R (2015) Assessment of wastewater treatment alternatives for small communities: An analytic network process approach. *Sci Total Environ* **532**: 676-687.

Naik MG & Duraphe MD (2012) Review paper on - parameters affecting bioremediation. *Int J Life Sci Pharma Res* **2**: 77-80.

Nwinyi OC, Nwodo CS, Amund OO (2008) Biodegradation potential of two *Rhodococcus* strains capable of utilizing aniline as carbon source in tropical ecosystem. *Res J Microbiol* **3**: 99-104.

Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Poliwoda A & Piotrowska-Seget Z (2014) Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 9385-9395.

Pasumarthi R, Chandrasekaran S & Mutnuri S (2013). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. *Mar Pollut Bull* **76**: 276-282.

Perelo LW (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* **177**: 81-89.

Pilon-Smits EAH (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 15-39.



- Pires FR, Souza CM, Silva AA, Procópio SO & Ferreira LR (2003) Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha* **21**: 335-341.
- Pinto MH, Martins RG & Costa JAV (2009) Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Quím Nova* **32**: 2104-2108.
- Prashar P, Kapoor N & Sachdeva S (2014) Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* **13**: 63-77.
- Prathiba JG, Keerthi K, Deshpande A, Bhattacharya S & Priyadarsini RI (2014) Molecular identification of the isolated diesel degrading bacteria and optimization studies. *J Biochem Tech* **5**: 727-730.
- Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato RR, Haller VV, Vázquez RR & Linares LF (2001) Adaptacion y seleccion de microorganismos autoctonos en Medios de cultivos enriquecidos con petroleo crudo. *Agrociencia* **20**: 423-434.
- Roy S, Dipak H, Debabrata B, Dipa B & Ranajit K (2002) Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World J Microbiol Biotechnol* **18**: 575-581.
- Sabir M, Waraich EA, Hakeem KR, Ozturk M, Ahmad HR & Shahid M (2015) Phytoremediation: Mechanisms and Adaptations. *Soil remediation and plants* **1**: 85-105.
- Santos CF & Novak E (2013) Plantas nativas do Cerrado e possibilidades em fitorremediação. *Rev Cienc Amb* **7**: 67-78.
- Santos HF, Carmo FL, Cury J, Rosado AS & Peixoto RS (2010) 18S rDNA sequences from microeukaryotes reveal oil indicators in mangrove sediment. *Plos One* **5**: 1-8.
- Schwab AP, Su J, Wetzell S, Pekarek S & Banks KM (1999) Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ Sci Technol* **33**: 1940-1945.
- Siciliano S & Germida J (1998) Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ Rev* **6**: 65-79.
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR & Christensen JH (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* **81**: 1084-1090.
- Speight JG & Arjoon KK (2012) *Biorremediation of Petroleum and Petroleum products*.
- Sun K, Liu J, Gao Y, Jin L, GU Y & Wang W (2014) Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. *Sci Rep* **4**: 1-10.
- Tanase AM, Ionescu R, Chiciudean I, Vassu T & Stoica I (2013) Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *Inter Biodeterior Biodegradation* **84**: 150-154.

Thapa B, Kumar KCA & Ghimire A (2012) A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *KUSET* **8**: 164-170.

Tonini RMCW, Rezende CE & Gravitol AD (2010) Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis* **14**: 1025-1035.

Ururahy AFP, Marins MDM, Vital RL, Gabardo IT & Pereira Jr N (1998) Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. *Rev Microbiol* **29**: 254-258.

Van Hamme JD, Singh A & Ward OP (2003) Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 503-549.

Vincent AO, Feliz E, Weltime MO, Ize-iyamu OK & Daniel EE (2011) Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. *Res J Chem Sci* **1**: 8-14.

Wetler-Tonini RMC, Rezende CE & Grativol AD (2011) Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. *Rev Virtual Quim* **3**: 78-87.

Zhang J, Fan S, Yang J, Du X, Li F & Hou H (2014). Petroleum contamination of soil and water, and their effects on vegetables by statistically analyzing entire data set. *Sci Total Environ* **476-477**: 258-265.

## CAPÍTULO IV

### **Imobilização de consórcios de bactérias degradadoras de petróleo extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras**

Suellyn Homan & Leila Teresinha Maranhão

#### **Resumo**

Para otimizar a biorremediação de ambientes contaminados com petróleo micro-organismos, comprovadamente degradadores de hidrocarbonetos podem ser combinados em consórcios e imobilizados para utilização em processos de bioaugmentação. Neste sentido, objetivou-se desenvolver um produto a partir da imobilização dos consórcios de bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras para degradação de petróleo. Sete bactérias foram combinadas em consórcios por meio de suas características morfofisiológicas. Para a imobilização destes consórcios, obteve-se biomassa bacteriana por meio de fermentação em biorreator e após foram preparadas microesferas de alginato e quitosana. Os consórcios demonstraram-se eficientes, visto que não foi verificada interferência entre os micro-organismos constituintes. As microesferas, obtidas a partir da imobilização desses consórcios, demonstraram alta viabilidade celular após a liofilização (74%), iniciando a liberação microbiana, quando ressuspensas, no tempo zero. Estes resultados indicam que a utilização de biomassa dos consórcios para a formação de microesferas é viável para preservação e armazenamento microbiano e a utilização de alginato e quitonasa como matrizes, raramente citada em outros estudos, é uma forma inovadora de otimizar este processo.

*Palavras-chave:* Biorremediação; micro-organismos; consórcio; imobilização.

#### **Introdução**

O petróleo constitui um dos mais importantes vetores da matriz energética mundial, pois fornece subprodutos que compõem a principal fonte de energia para as indústrias e atividades diárias da população (Speight, 2012; Speight, 2014). Entretanto, também é uma das causas mais agravantes de poluição ambiental (Aleixo *et al.*, 2007; Weber; Santos, 2013), causada por processos de extração, refino, processamento, transporte, além de derramamentos, vazamentos acidentais e rompimentos de tubulações (Aleixo *et al.*, 2007; Das & Chandran, 2011; Malik *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Devido, principalmente, à sua complexidade química, estabilidade molecular e baixa solubilidade em água, normalmente o tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo torna-se complexo e problemático (Jacques *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2010; Andreolli *et al.*, 2011). Constitui, desta forma, um grave risco ambiental, que necessita de gerenciamento constante (Lopes & Piedade, 2010), sendo necessária a utilização de técnicas para a remediação do local afetado.

As tecnologias empregadas para a remediação de solo contaminado com petróleo estão relacionadas à lavagem do solo contaminado (Hans-Holgar & Alexander, 2000; Juck *et al.*, 2000; Frutos *et al.*, 2012), extração por solventes (Gan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012; Mohanty *et al.*, 2013), ventilação do solo (Amro, 2004; Andrade *et al.*, 2010), tratamento térmico, como a dessorção térmica (Terratherm, 2003; Amro, 2004; Falciglia *et al.*, 2011), além de almofadas esteiras-padrão (Buyukkamaci & Kucukselek, 2007). Esses são métodos onerosos e geram grande perturbação local na aplicação e, em muitos casos, são economicamente inviáveis (Sangabriel *et al.*, 2006; Soleimani *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

Surge, então, a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais viáveis e sustentáveis para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo, dentre as quais destacam-se a fito e a biorremediação (Jacques *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2009; Molinos-Senante *et al.*, 2015). A fitorremediação caracteriza-se pela utilização de plantas e micro-organismos associados à rizosfera - região do solo sob influência da presença de raízes, onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas (Macek *et al.*, 2000) - para remover, degradar ou estabilizar contaminantes presentes no solo (Cunningham *et al.*, 1996a; Gerhardt *et al.*, 2009; McGuinness & Dowling, 2009; Ighovie & Ikechukwu, 2014), devido à capacidade desses vegetais tolerarem os contaminantes (Inckot *et al.*, 2011). Esta estratégia, utilizada na fitorremediação, é chamada de rizodegradação e apresenta-se como uma técnica promissora para o tratamento e recuperação de solos contaminados com petróleo, constituindo o processo de biorremediação (Cunningham *et al.*, 1996; Farias *et al.*, 2009; Gerhardt *et al.*, 2009; Thapa *et al.*, 2012).

A biorremediação caracteriza-se pelo uso de micro-organismos, fungos, bactérias e leveduras, com o objetivo de degradar, eliminar ou transformar contaminantes, presentes no solo, em compostos menos prejudiciais ao ecossistema (McGuinness & Dowling, 2009; Luqueño *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Weber & Santos, 2013; Singh *et al.*, 2014; Adams *et al.*, 2015). Esses micro-organismos possuem a capacidade metabólica de degradar os hidrocarbonetos e utilizá-los como fonte de carbono e energia, sendo capazes de reverter os

danos causados pelo petróleo e/ou por seus derivados no ambiente (Magot *et al.*, 2000; Da Cruz *et al.*, 2011; Weber & Santos, 2013).

Embora vários contaminantes possam ser metabolizados pelos micro-organismos presentes na rizosfera, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros, devido à sua estrutura química (Mariano *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2010). Desta forma, para a degradação de hidrocarbonetos mais complexos, é necessária a cooperação sinérgica entre os micro-organismos (Ururary *et al.*, 1998; Mariano *et al.*, 2007), que pode ser realizada através do estabelecimento de consórcios, que contenham micro-organismos que se complementem metabolicamente (Tiburtius *et al.*, 2004; Medina-Moreno *et al.*, 2005; Herrero & Stuckey, 2015).

Para aumentar a eficiência do processo, podem ser desenvolvidas técnicas de imobilização para os consórcios, a fim de que seja preservada a atividade catalítica desejada (Covizzi *et al.*, 2007) e que os micro-organismos sejam protegidos da competição natural com a microbiota local (Wang *et al.*, 2012) e da ação tóxica dos contaminantes (Lin *et al.*, 2014), possibilitando maior eficiência na degradação de petróleo (Carvalho, 2006).

O objetivo da presente pesquisa foi desenvolver um produto a partir da imobilização de consórcios de bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitoremediadoras (*Echinochloa polystachya* (Kunth) Hitchc., *Mimosa scabrella* Bentham e *Sesbania punicea* (Cav.) Benth.) para a degradação de petróleo, com fins de prospecção e aplicação biotecnológica.

## **Material e métodos**

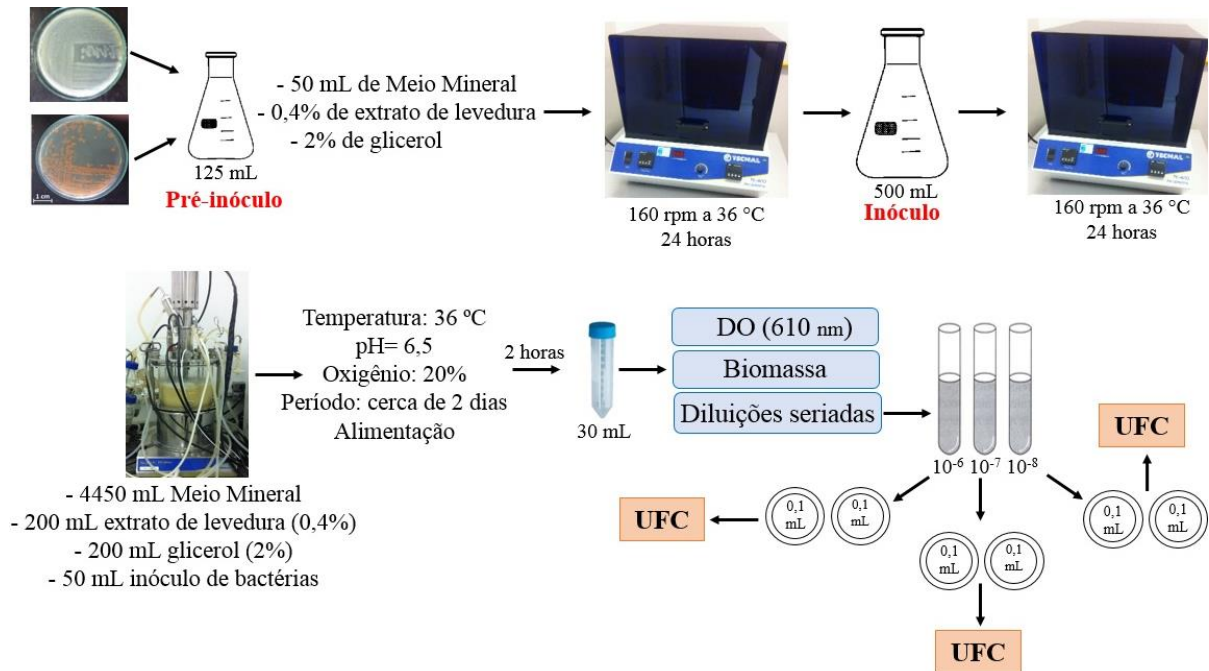
Constituíram-se objeto de estudo da presente pesquisa sete bactérias, quatro isoladas da rizosfera de *E. polystachya*, duas da rizosfera de *M. scabrella* e uma de *S. punicea*. Estas bactérias foram identificadas molecularmente, sendo cinco delas pertencentes ao gênero *Bacillus*, uma pertencente ao gênero *Stenotrophomonas* e uma ao gênero *Microbacterium*.

### **Estabelecimento dos consórcios bacterianos**

Para a definição dos consórcios bacterianos considerou-se as principais características das bactérias, como tamanho, morfologia, tempo de crescimento, potencial de degradação de petróleo, capacidade de produção de biossurfactante.

## Fermentação dos consórcios bacterianos em biorreator

Com a finalidade de obter um produto a partir da imobilização dos consórcios bacterianos, inicialmente, com o auxílio de um biorreator de bancada Tec Bio (7,5 L), foi produzida biomassa bacteriana. Os procedimentos utilizados estão descritos na Fig. 1.



**Fig. 1.** Esquema representativo dos procedimentos realizados para a fermentação dos cinco consórcios bacterianos em biorreator.

Para cada bactéria, duas colônias foram transferidas para um frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio mineral ( $K_2HPO_4$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $(NH_4)_2SO_4$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,5 g.L<sup>-1</sup>;  $FeCl_2 \cdot 1H_2O$  - 10 mg.L<sup>-1</sup>;  $MnCl_2$  - 0,1 mg.L<sup>-1</sup>;  $ZnSO_4$  - 0,01 mg.L<sup>-1</sup>;  $CaCl_2$  - 10 mg.L<sup>-1</sup>; 1000 mL de água destilada) (Déziel *et al.*, 1996), enriquecido com 0,4% de extrato de levedura e 2% de glicerol, que foi mantido sob agitação em “shaker” TE-420 a 36 °C e 160 rpm por 24 horas. Após, esse volume foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio mineral, também enriquecido com extrato de levedura e glicerol, nas mesmas proporções, que foi incubado sob as mesmas condições.

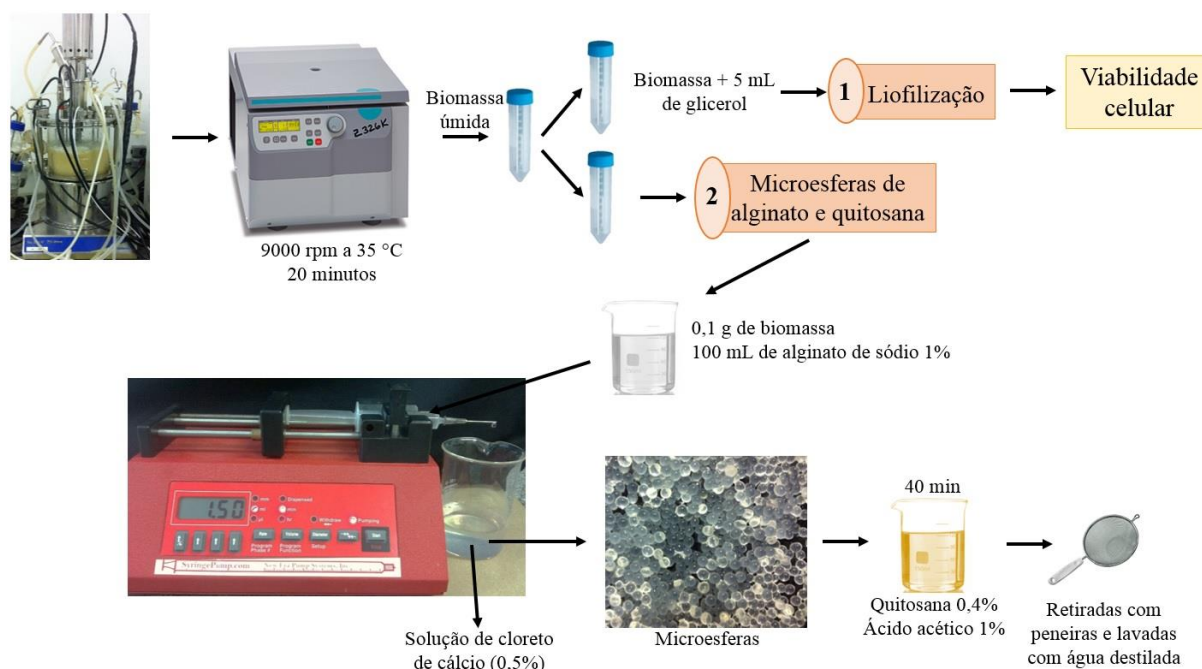
Posteriormente, foram adicionados, no biorreator esterilizado, 4450 mL de meio mineral, enriquecido com 200 mL de extrato de levedura a 0,4% e 200 mL de glicerol a 2%, e 1% do inóculo das bactérias correspondentes ao consórcio analisado (50 mL), com o intuito de realizar o acompanhamento do crescimento bacteriano. A temperatura do biorreator foi ajustada para 36 °C e a quantidade de oxigênio dissolvido para 20%. Preparou-se ainda, para o controle

do pH em aproximadamente 6,5, uma solução de 200 mL de ácido fosfórico 10% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e uma solução de 200 mL de Hidróxido de Sódio 3M ( $\text{NaOH}$ ).

Cada consórcio bacteriano permaneceu cerca de dois dias no biorreator. O biorreator foi alimentado com 400 mL de substrato (extrato de levedura e glicerol), conforme descrito acima, quando atingiu-se a fase estacionária, monitorada pela quantidade de oxigênio dissolvido. A cada duas horas foram retiradas amostras de 30 mL. Destas amostras, com a finalidade de avaliar o crescimento e aumento de biomassa, realizou-se a análise de densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 610 nm ( $\text{DO}_{610}$ ). E para verificar a competição entre as bactérias, para cada amostra, realizou-se diluições seriadas em tubos contendo salina 0,9%, e 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das últimas diluições ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ ) foram inoculadas, por meio do método espalhamento em superfície, em placas de Petri, contendo ágar nutriente (AN). Estas placas permaneceram em estufa a 36 °C por 24 horas. Após, realizou-se a contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Além disso, para cada amostra retirada do biorreator, fez-se a análise gravimétrica para a quantificação da biomassa bacteriana de cada consórcio. Para isso, foram adicionados 5 mL de amostra em tubos cônicos, que foram centrifugados a 9000 rpm por 20 minutos e após foram transferidos para estufa a 105 °C, até atingirem peso constante (adaptado de Makkar & Cameotra, 1998). Em seguida, calculou-se a concentração de biomassa para cada amostra em  $\text{g.L}^{-1}$ .

### **Imobilização dos consórcios bacterianos**

Após a fermentação dos consórcios em biorreator e a obtenção de biomassa bacteriana, estes foram submetidos a procedimentos para sua imobilização, por meio de liofilização da biomassa e preparo de microesferas de alginato e quitosana. Estes procedimentos podem ser observados na Fig. 2.



**Fig. 2.** Esquema representativo dos procedimentos utilizados para a imobilização dos consórcios bacterianos, por meio de liofilização da biomassa e preparo de microesferas de alginato e quitosana.

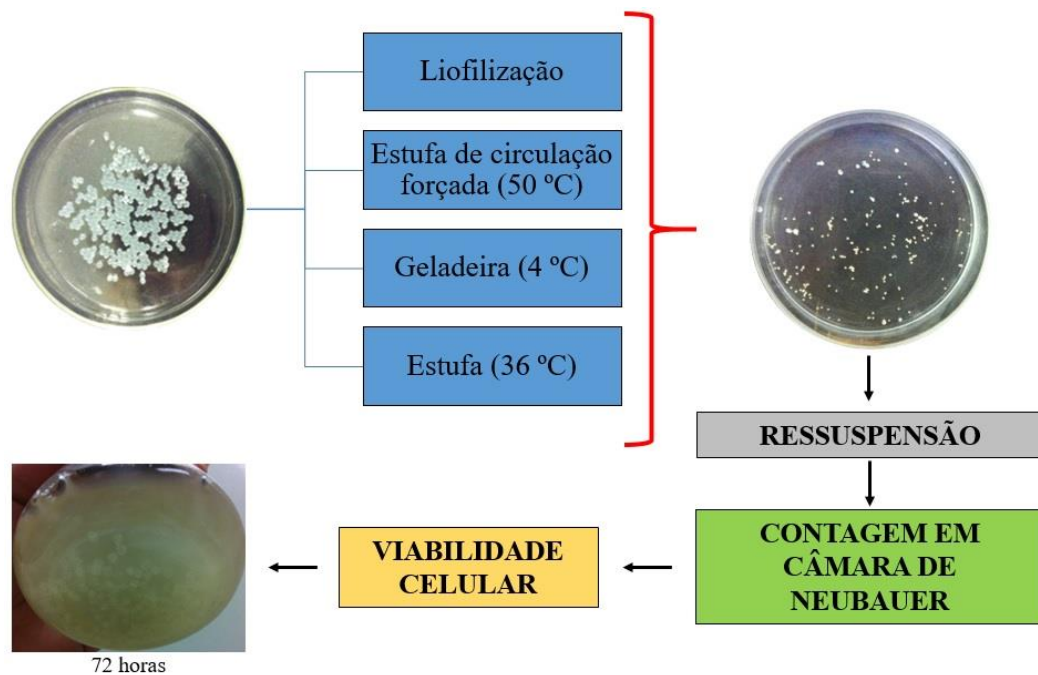
O caldo fermentado foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 9000 rpm por 20 min a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa obtida armazenada em tubos cônicos. Posteriormente, calculou-se a biomassa úmida e a concentração final em base úmida e seca. A quantidade total de biomassa úmida obtida foi pesada e dividida em dois frascos. A biomassa de um dos frascos, juntamente com 5 mL de glicerol, utilizado como crioprotetor, foi congelada em freezer por 24 horas e posteriormente, foi liofilizada. Para isto, as células foram congeladas a -40 °C e liofilizadas (ILSHIN - 20 L) sob vácuo a  $140 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  por cerca de 48 horas (Santo *et al.*, 2013). Após, pesou-se e calculou-se a biomassa seca liofilizada. Para cada consórcio, 0,01 g de biomassa seca foi ressuspensa em 10 mL de solução salina 9% e realizou-se contagem em câmara de Neubauer para cálculo da viabilidade celular, utilizando o corante azul de metileno.

Com a biomassa úmida armazenada no segundo frasco foram preparadas as microesferas de alginato e quitosana, para a imobilização dos consórcios bacterianos. Inicialmente, 0,1 g de biomassa bacteriana foi diluída em uma solução de 100 mL de alginato de sódio em pó 1%, com o auxílio de um agitador magnético. Após, foi gotejada, com uma seringa de 3 mL, sobre uma solução de cloreto de cálcio 0,5% ( $\text{CaCl}_2$ ), com o auxílio de uma bomba de seringa programável Syringepump, calibrada para liberar gotas padronizadas



a  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Burgain *et al.*, 2011). Após a imobilização dos consórcios utilizando alginato, estes permaneceram em uma solução contendo 100 mL de ácido acético 1% e 0,4% de quitosana em pó, por 40 minutos, sendo agitados a cada cinco minutos. Por fim, as microesferas foram retiradas com o auxílio de peneiras de aço inoxidável Mesh 35 (abertura de 0,5 mm) e lavadas com água destilada (Kamalian *et al.*, 2014).

Posteriormente, as microesferas foram divididas e armazenadas em placas que Petri, em duplicata, para cada consórcio, e foram submetidas a procedimentos, conforme esquematizado na Fig. 3.



**Fig. 3.** Esquema simplificado do processo de secagem das microesferas por meio de diferentes procedimentos para a seleção do método mais eficiente de desidratação.

Cada placa, contendo as microesferas, foi seca por meio de diferentes procedimentos, com o intuito de selecionar o melhor método de desidratação. Foram testados: liofilização das microesferas, estufa de circulação forçada a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , geladeira a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e estufa a  $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . As microesferas permaneceram nestes locais até sua secagem completa e peso constante. Então, foram ressuspensas em 10 mL de solução salina 9% e, após, realizou-se a contagem de células viáveis em Câmara de Neubauer para a verificação da viabilidade celular, utilizando o corante azul de metileno.

Após a seleção do método de desidratação mais eficiente, para confirmação da capacidade de liberação dos consórcios de micro-organismos imobilizados, foram preparados reatores em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio mineral, enriquecido

com 0,4% de extrato de levedura e 2% de glicerol. Em cada reator, preparado em triplicata para cada intervalo de tempo (0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h e 72h), 25 microesferas desidratadas foram ressuspensas. Todos esses frascos foram mantidos sob agitação em incubadora refrigerada “shaker” TE-420 a 36 °C e 160 rpm. Para cada tempo, foram retiradas alíquotas de 5 mL das suspensões, as quais foram utilizadas para a contagem de células em Câmara de Neubauer, a fim de realizar-se o acompanhamento da liberação dos consórcios de micro-organismos. Além disso, em cada intervalo de tempo, as microesferas foram coletadas, armazenadas em placas de Petri e secas em estufa à 36 °C.

### Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel e a análise estatística foi conduzida com o auxílio do software Past, versão 3.10. Aplicou-se o teste de correlação de postos de Spearman (r), com o intuito de verificar as correlações entre os parâmetros densidade óptica e biomassa, sendo considerados os valores de referência conforme Callegari-Jacques (2003), em que em que:  $0 < r < 0,30$  (positiva fraca),  $0,30 \leq r < 0,60$  (positiva regular),  $0,60 \leq r < 0,90$  (positiva forte),  $r = 0,90 \leq r < 0,99$  (positiva muito forte) e  $r = 1,00$  (positiva perfeita).

### Resultados e discussão

#### Estabelecimento dos consórcios bacterianos

A partir da combinação das sete bactérias isoladas da rizosfera de plantas fitorremediadoras de solos contaminados com petróleo, foram definidos cinco consórcios bacterianos (C1, C2, C3, C4, C5), conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Consórcios bacterianos com capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Consórcio	Bactérias
C1	<i>Bacillus sp.</i> <sup>1</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>2</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>3</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>4</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>5</sup>
C2	<i>Bacillus sp.</i> <sup>2</sup> , <i>Stenotrophomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>3</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>5</sup>
C3	<i>Bacillus sp.</i> <sup>1</sup> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>4</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>5</sup>
C4	<i>Stenotrophomonas sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>2</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>5</sup>
C5	<i>Stenotrophomonas sp.</i> , <i>Microbacterium sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>4</sup> , <i>Bacillus sp.</i> <sup>5</sup>

Os micro-organismos, individualmente, podem degradar vários contaminantes orgânicos e se adaptar a diferentes ambientes, o que pode contribuir para a eficiência da biorremediação (Mao *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014). Porém, a utilização de consórcios de micro-organismos no tratamento de ambientes contaminados com petróleo, permite a otimização deste processo. Esta maior eficiência ocorre devido à cooperação sinérgica entre os micro-organismos, em que cada espécie desempenha uma função específica no ambiente, aumentando a possibilidade de degradação de diferentes compostos (Faulwetter *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014; Herrero & Stuckey, 2015).

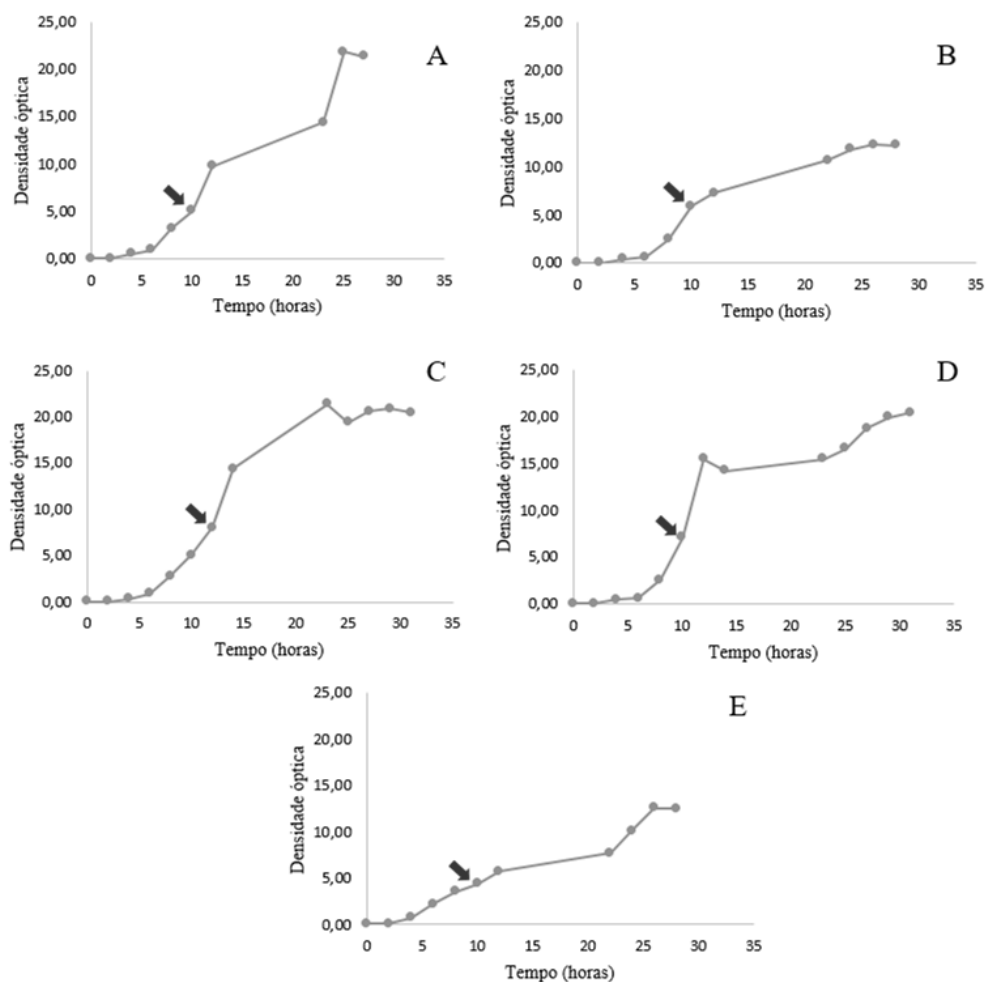
Esta otimização do processo de biorremediação pelos consórcios microbianos frente aos micro-organismos individuais é exemplificada por Gallego *et al.* (2007). Em seu estudo, com quatro micro-organismos (*Nocardiodes simplex*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Rhodotorula graminis*), confirmaram experimentalmente que a biodegradação de diferentes compostos de petróleo pelo consórcio microbiano foi mais eficiente quando comparado à utilização dos micro-organismos isolados. Da mesma forma, Al-Wasify & Hamed (2014), analisando *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Acinetobacter lwoffii*, verificaram que o consórcio bacteriano foi capaz de degradar 88,5% do petróleo após 28 dias de incubação. Já estas mesmas bactérias individualmente degradaram, respectivamente, 77,8%, 76,7% e 74,3%. Chen *et al.* (2014), avaliando bactérias isoladas e consórcios para degradação de petróleo, verificaram que o consórcio foi capaz de degradar 12,83% mais do que a cultura pura, o que corrobora com a hipótese de que os consórcios são mais eficazes e otimizam o processo de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo.

### **Obtenção de biomassa dos consórcios bacterianos**

Com relação ao monitoramento do processo de fermentação, foi constatado, para cada consórcio, um período de tempo distinto para atingir a fase estacionária de crescimento celular, variando, de modo geral, entre 9 horas e 30 minutos e 12 horas e 30 minutos (Fig. 4). De modo similar, Liu *et al.* (2016), avaliando o desempenho de *Acinetobacter* sp. durante seu processo fermentativo, verificaram que este micro-organismo entrou numa fase estacionária após, aproximadamente, 12 horas de fermentação.

Além disso, os consórcios apresentaram tempos distintos de fermentação, sendo 28 horas de fermentação para o consórcio C1, 27 horas e 30 minutos para C2, sendo este o menor tempo relatado, 30 horas e 50 minutos para C3, 31 horas para C4, sendo este o maior tempo verificado e 28 horas e 30 minutos para o consórcio C5.

Em relação à densidade óptica, para os cinco consórcios, observaram-se variações, de modo geral, entre 0,01 a 20,50. Com base na densidade óptica e tempo de crescimento de cada consórcio microbiano, foram elaborados gráficos, conforme pode ser observado na Fig. 4.



**Fig. 4.** Curvas de crescimento dos consórcios bacterianos, em que densidade óptica está em função do tempo (horas). A - C1 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); B - C2 (*Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); C - C3 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); D - C4 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); E - C5 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>). Seta - Alimentação do biorreator com substrato.

Por meio das contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), verificou-se que, para todos os consórcios microbianos, o crescimento de um micro-organismo não influenciou no desenvolvimento dos demais, visto que todas as bactérias foram relatadas em praticamente todas as amostras analisadas, como pode ser observado nas Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6.

**Tabela 2.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C1.

C1		Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )														
Tempo	Diluição 10 <sup>6</sup>					Diluição 10 <sup>7</sup>					Diluição 10 <sup>8</sup>					
	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	
0h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
2h	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4h	300	0	0	1700	800	200	0	500	800	0	0	0	100	1400	0	
	200	0	0	1800	500	0	0	200	300	0	0	200	200	100	0	
6h	0	0	0	0	0	200	0	0	800	600	0	0	0	600	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	700	300	0	0	0	600	0	
8h	600	400	0	1500	1200	0	0	200	300	0	100	200	0	1700	0	
	200	200	0	1700	1500	0	0	0	400	100	0	100	0	1300	0	
10h	200	0	0	4100	1400	100	0	900	3100	300	0	0	0	2300	700	
	200	0	0	4500	600	0	400	100	2900	200	0	0	300	1700	0	
12h	300	0	0	4500	1100	200	0	0	2000	0	400	0	0	0	0	
	400	0	0	4800	1000	0	0	0	2200	0	100	0	0	0	0	
23h	400	300	0	6100	1000	0	2100	0	4500	200	100	500	0	1200	0	
	600	200	0	5800	1200	300	2000	0	5100	500	200	500	0	1500	0	

**Tabela 2.** Continuação.

C1		Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )														
Tempo	Diluição 10 <sup>6</sup>					Diluição 10 <sup>7</sup>					Diluição 10 <sup>8</sup>					
	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	
25h	200	4100	0	5800	500	500	2800	0	4200	500	300	1800	0	2200	100	
	100	4000	0	6100	800	400	3100	0	3800	800	200	1600	0	3100	200	
27h	700	3200	600	6200	100	200	200	400	3800	1000	200	0	0	3300	1000	
	500	3800	600	5900	0	600	300	0	4100	1200	300	0	100	3200	9000	

**Tabela 3.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C2.

C2		Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
Tempo	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>				
	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	
0h	0	100	0	0	100	0	200	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	
2h	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	100	200	0	0	0	0	0	0	0	0	
4h	100	0	500	1200	0	0	0	300	0	0	100	100	
	200	0	1100	1600	0	0	0	400	0	0	200	0	

**Tabela 3.** Continuação.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>3</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
6h	800	200	1200	2100	100	0	200	100	0	0	100	800
	900	300	500	2100	100	0	100	200	0	0	200	0
8h	0	600	0	3100	0	0	0	300	0	100	0	0
	100	500	0	6900	0	0	0	300	0	0	0	0
10h	300	0	0	6100	100	0	0	2500	0	0	0	0
	200	100	0	6400	0	200	0	2700	0	0	100	100
12h	100	700	200	7200	200	0	200	5500	0	0	200	3000
	200	200	0	8100	300	300	0	5100	0	0	500	3400
22h	1200	1000	500	3200	700	100	1100	1000	300	0	100	800
	800	1000	1200	3400	1000	200	1000	2600	200	0	100	200
24h	800	300	1200	4100	500	0	2000	1800	300	0	400	600
	1100	200	800	3200	600	0	300	3000	400	200	200	900
26h	2000	500	10	2900	1500	0	800	1000	100	0	100	300
	1800	400	800	3500	800	0	500	1000	200	100	0	500
28h	1500	300	700	3000	600	0	200	1200	100	0	0	200
	1300	400	1000	2800	800	0	400	1100	100	100	100	200

**Tabela 4.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C3.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
0h	300	0	5300	200	0	0	1300	0	0	0	0	0
	0	500	5900	100	100	0	1400	0	0	0	200	0
2h	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	3900	600	0	500	100	0	0	0	0	0	0	0
	2500	100	0	200	0	0	0	100	0	0	0	100
6h	2500	300	1000	200	1000	200	0	0	0	0	0	0
	2900	200	1500	0	1200	200	0	0	400	0	0	100
8h	3200	200	300	0	1500	400	100	0	400	300	200	100
	3600	300	500	100	1100	600	0	0	800	700	500	200
10h	300	600	200	100	200	2000	0	100	100	100	0	0
	1500	200	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0
12h	4200	700	500	100	1200	500	200	0	200	100	0	0
	5100	200	0	1200	1000	700	100	0	1000	0	0	0
14h	0	1400	10800	0	1200	2300	1000	0	300	4400	0	0
	1600	1500	10800	0	2500	1500	800	0	400	0	0	0



**Tabela 4.** Continuação.

Tempo	C3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>1</sup>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
23h	2000	300	1400	1200	1100	400	300	500	0	0	0	100
	2100	1000	1200	600	1600	0	0	200	100	0	0	100
25h	3500	1800	600	500	1400	200	200	100	0	0	100	300
	4100	1000	500	1200	1700	400	200	0	0	100	0	0
27h	4600	800	500	700	1000	400	200	0	400	100	0	0
	3800	700	300	900	3000	0	100	300	200	100	0	0
29h	4100	800	800	2200	1900	0	0	200	100	0	0	100
	3600	400	700	4100	1000	0	0	100	100	0	0	0
31h	4400	800	2000	1300	700	100	200	200	400	100	0	100
	3800	600	1000	1600	600	200	200	1300	2100	1300	400	200

**Tabela 5.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C4.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
0h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6h	400	0	500	0	0	0	0	0	0	0	13800	0
	800	300	1900	600	0	100	800	0	0	100	0	0
8h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10h	400	300	0	0	800	600	200	0	0	0	0	0
	600	400	0	1000	1200	600	0	0	0	100	0	0
12h	2700	5400	6000	1100	400	1000	100	0	0	700	0	0
	4200	7700	1500	700	400	1300	0	0	200	300	0	0
14h	10100	15200	6400	2800	2900	6800	800	0	200	700	0	0
	9600	21600	7200	3600	1700	3600	400	0	100	400	0	0

**Tabela 5.** Continuação.

C4		Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )										
Tempo	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>2</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
23h	2000	6500	12300	2400	0	1200	2400	600	0	100	500	0
	2200	6800	10600	3900	200	800	1700	500	0	100	500	0
25h	1800	2500	14900	3000	400	500	3000	0	100	0	500	0
	1500	2400	14600	2500	900	600	3200	0	0	0	1100	0
27h	600	1600	11800	1700	800	000	1300	0	0	0	200	0
	1200	2000	12100	1500	200	1000	1300	0	0	100	1000	0
29h	2700	1100	9200	1200	400	800	2000	0	0	0	1000	0
	1900	1500	8100	600	200	200	1800	300	0	0	300	0
31h	3000	2500	12800	2300	500	0	3600	400	0	0	100	100
	1800	4000	14800	1900	600	400	3000	300	0	0	500	0

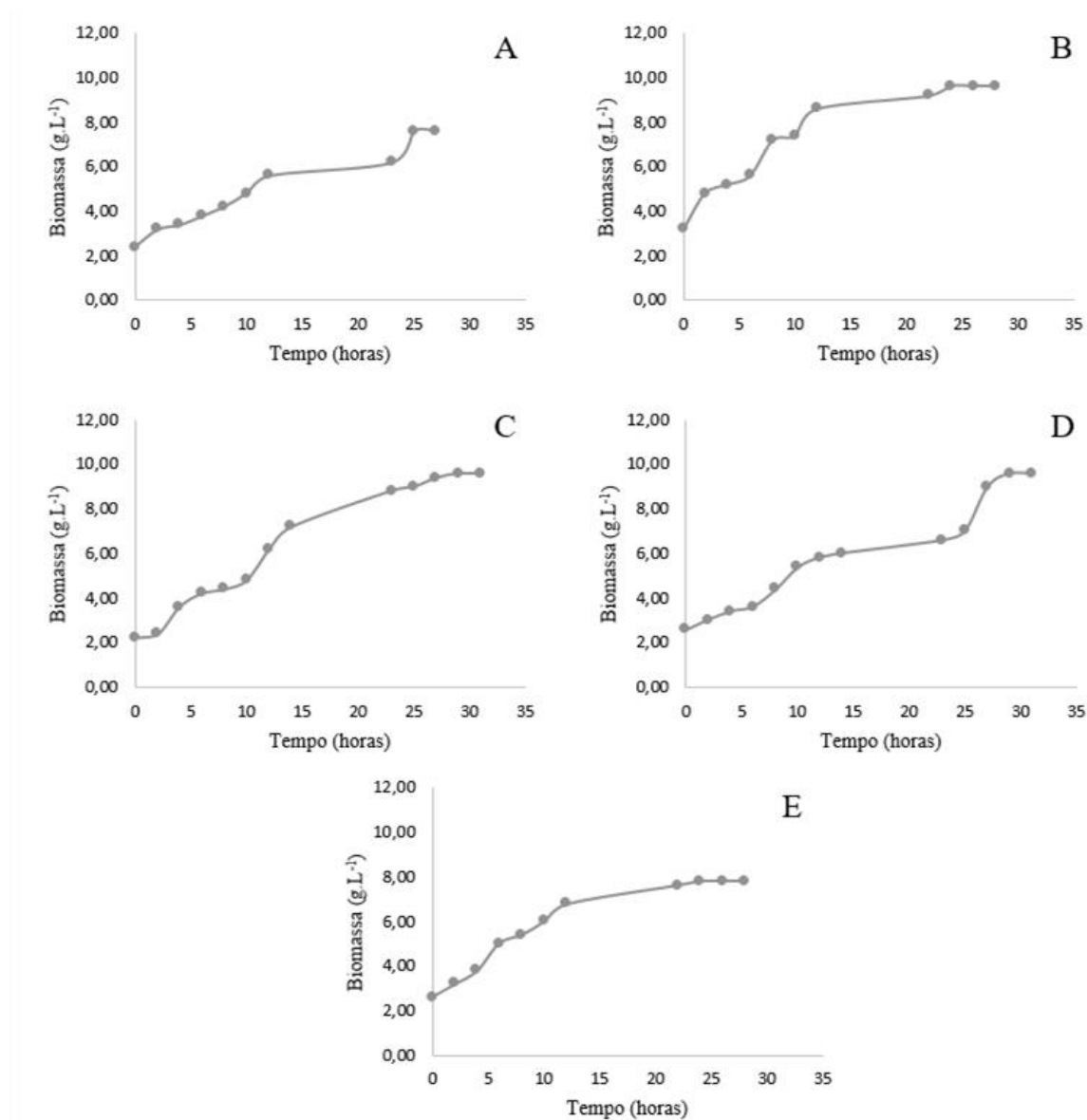
**Tabela 6.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) nos diferentes intervalos de tempo para a fermentação do consórcio C5.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
0h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0
	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4h	6000	400	200	900	5600	1500	3600	3500	0	0	0	0
	1200	300	300	1000	300	0	0	900	0	0	0	0
6h	2100	900	1300	1400	2600	0	800	1300	0	0	100	100
	800	300	500	1800	500	0	100	200	0	0	0	0
8h	11200	1200	600	0	3100	1600	100	1000	100	0	500	0
	7300	1700	600	400	100	200	400	1200	0	0	800	0
10h	4800	800	200	1600	2800	1600	100	1200	1800	300	1600	0
	5500	700	100	1500	0	1100	300	400	1000	200	0	1500
12h	5400	7000	1600	5700	0	500	100	2200	0	0	200	0
	8300	8100	1600	1000	6200	2500	100	400	700	0	400	900
22h	2900	1400	2000	800	500	500	300	200	0	100	300	400
	3600	1000	1400	2400	200	600	100	100	0	100	1200	600

**Tabela 5.** Continuação.

Tempo	C5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL <sup>-1</sup> )											
	Diluição 10 <sup>6</sup>				Diluição 10 <sup>7</sup>				Diluição 10 <sup>8</sup>			
	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>	<i>S. sp.</i>	<i>M. sp.</i>	<i>B. sp.</i> <sup>4</sup>	<i>B. sp.</i> <sup>5</sup>
24h	0	200	700	0	0	200	500	0	0	0	0	0
	0	200	1000	100	0	0	2100	0	200	100	100	0
26h	200	0	1700	100	0	100	300	0	0	100	100	0
	300	700	400	100	0	100	100	0	0	100	100	0
28h	100	200	1000	200	0	0	200	0	0	100	100	0
	200	400	500	0	0	100	100	0	0	200	0	0

Conforme a análise gravimétrica para a quantificação da biomassa bacteriana de cada consórcio, verificou-se, de modo geral, concentrações de biomassa variando de 2,20 a 9,60 g.L<sup>-1</sup>, sendo a maior variação observada para o consórcio C3. Com base nestes dados de biomassa e tempo, foram elaborados gráficos que podem ser observados na Fig. 5.



**Fig. 5.** Curvas de crescimento dos consórcios bacterianos, em que a biomassa microbiana está em função do tempo (horas). A - C1 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); B - C2 (*Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); C - C3 (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); D - C4 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>); E - C5 (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup>, *Bacillus* sp.<sup>5</sup>).

Por meio da Correlação de Spearman foi possível verificar a correlação entre as variáveis biomassa e densidade óptica, durante o processo de fermentação dos consórcios bacterianos em biorreator. Para todos os consórcios foram observadas correlações positivas entre estes parâmetros. Para o consórcio C1, houve correlação positiva perfeita ( $r= 1,00$ ); para C3 observou-se correlação positiva muito forte ( $r =0,94$ ) e para os consórcios C2, C4 e C5 houve também correlação positiva muito forte ( $r= 0,99$ ). Estes dados comprovam que tais parâmetros, ao se relacionarem, demonstram a utilização do substrato pelas bactérias e o consequente crescimento das mesmas no meio.

### Imobilização dos consórcios bacterianos

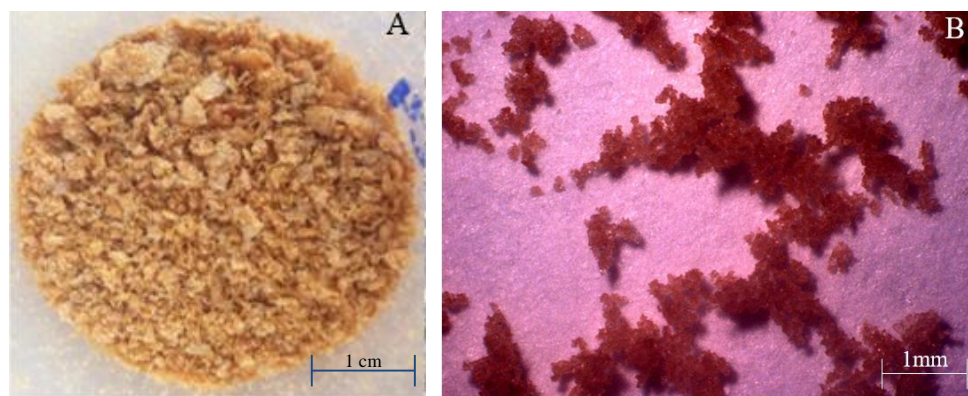
Em relação à biomassa dos consórcios de micro-organismos após a fermentação, observou-se que os menores valores de biomassa úmida e seca foram verificados para o consórcio C5, sendo 50,35 g e 15,12 g, respectivamente. Já os maiores valores de biomassa foram observados para o consórcio C3, sendo, respectivamente, 451,88 g e 30,66 g, conforme apresentado na Tabela 7.

Já para a concentração final em bases úmida e seca, verificou-se que para a primeira houve variação de 12,59 a 129,11  $\text{g.L}^{-1}$ , verificadas para os consórcios C5 e C3, respectivamente. Em relação à segunda, observou-se uma variação de 3,78  $\text{g.L}^{-1}$ , para o consórcio C5, a 10,24  $\text{g.L}^{-1}$ , relatado para o consórcio C2 (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores de biomassa, úmida e seca, concentração final em bases úmida e seca e viabilidade celular da biomassa seca liofilizada do processo de fermentação dos consórcios bacterianos para a degradação de petróleo.

Consórcio	Biomassa úmida (g)	Biomassa seca (g)	Concentração final em base úmida ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Concentração final em base seca ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Viabilidade biomassa seca (%)
C1	207,53	22,92	51,88	5,73	92,95
C2	154,76	25,60	61,90	10,24	91,00
C3	451,88	30,66	129,11	8,76	82,32
C4	217,08	20,30	54,27	5,08	88,36
C5	50,35	15,12	12,59	3,78	86,74

Além disso, por meio de contagem em Câmara de Neubauer, verificou-se que a biomassa, após ser liofilizada (Fig. 6), ainda apresenta alto percentual de viabilidade celular, variando, de modo geral, de cerca de 82 a 93%, como pode ser observado na Tabela 7.



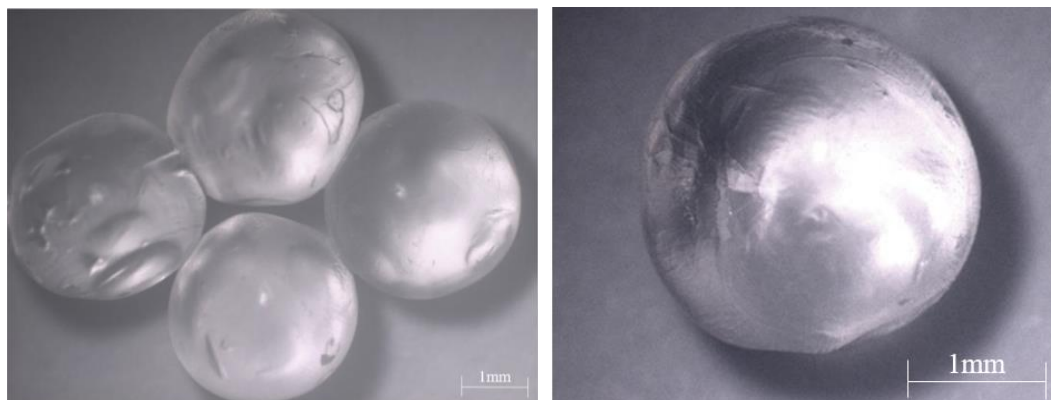
**Fig. 6.** Biomassa do consórcio bacteriano C4 liofilizada. A- Aspecto geral. B - Detalhes do produto obtido em microscópio estereocópio.

Miyamoto-Shinohara *et al.* (2000), avaliando as taxas de sobrevivência de 10 espécies de micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Brevibacterium flavum*, *B. lactofermentum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *C. glutamicum*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida* e *Alcaligenes faecalis*) após o processo de liofilização, obtiveram taxas viabilidade microbiana entre 50 e 80%, valores inferiores aos constatados no presente estudo.

A liofilização é um processo que foi utilizado no presente estudo para o congelamento e desidratação dos consórcios de micro-organismos, juntamente com a utilização do glicerol, substância crioprotetora, adicionada à suspensão de células, com o intuito manter as altas taxas de viabilidade microbiana, garantindo a efetividade deste processo.

Em relação as microesferas, contendo consórcios de micro-organismos imobilizados em alginato e quitosana, observou-se que estas apresentaram tamanhos uniformes e resistência quanto à manutenção da forma esférica, como pode ser observado na Fig. 7. Esta resistência das microesferas está diretamente ligada à utilização destes dois polissacarídeos em conjunto, visto que o alginato é a matriz responsável pela homogeneização dos micro-organismos e estabelecimento do tamanho das microesferas, assim como de sua forma esférica e a quitosana faz o revestimento deste produto.



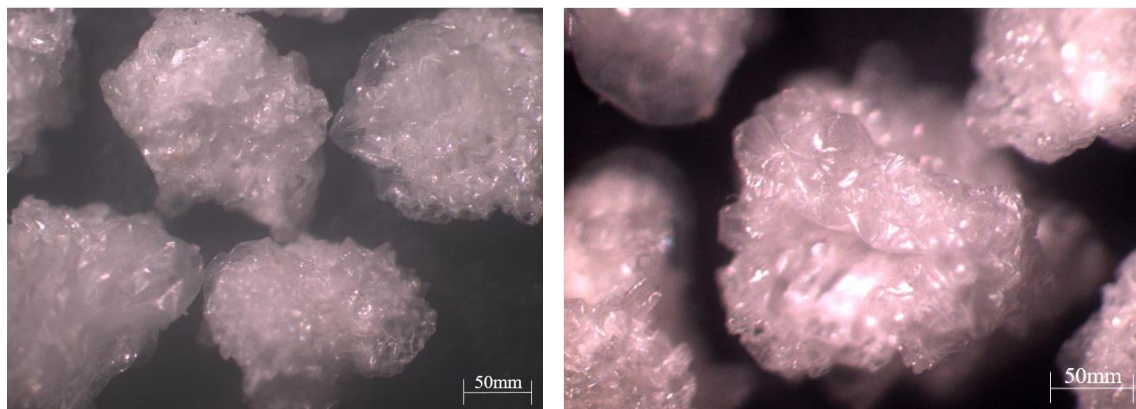


**Fig. 7.** Aspecto das microesferas de alginato e quitosana contendo o consórcio bacteriano.

O alginato e a quitosana são polissacarídeos de ocorrência natural, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (Gentili *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2009; Lee & Mooney, 2012; Angelim *et al.*, 2013), sendo amplamente utilizados como matrizes para o preparo de microesferas (Tran *et al.*, 2011). Estevinho *et al.* (2014) e Xiao *et al.* (2013) relatam que, por meio da utilização destes polissacarídeos como matrizes, há a possibilidade de liberação controlada dos micro-organismos no ambiente. São importantes também na proteção dos micro-organismos contra a ação tóxica do contaminante (Wang *et al.*, 2012), além de protegê-los da competição com a microbiota local (Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

Em relação aos quatro procedimentos adotados para a desidratação das microesferas, observaram-se maiores taxas de viabilidade celular para as microesferas liofilizadas (73,47%), seguidas pelas secas em geladeira a 4 °C (72,42%), secas em estufa a 36 °C (62,18%) e, por último, secas em estufa de circulação forçada a 50 °C (48,67%).

Ao considerar aspectos econômicos, tamanho e forma das microesferas após desidratação, comercialização e utilização do produto em meio contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, a desidratação das microesferas por meio da liofilização (Fig. 8) constitui-se como um método que garante maior viabilidade quando comparado aos outros métodos testados. Desta forma, este método foi selecionado e empregado para a imobilização da biomassa dos consórcios bacterianos obtida por fermentação em biorreator.



**Fig. 8.** Microesferas liofilizadas, contendo consórcio de micro-organismos degradadores de petróleo (produto pronto para aplicação em ambientes contaminados).

Após o processo de liofilização, constatou-se resultado similar em relação ao peso úmido/peso seco das microsferas quando comparados, entre si, os cinco consórcios microbianos, como pode ser observado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Médias $\pm$ desvios-padrão do peso das microsferas antes (peso úmido) e após o processo de liofilização (peso seco) dos consórcios bacterianos (n=2).

	C1	C2	C3	C4	C5
Peso úmido (g)	18,57 $\pm$ 0,07	18,29 $\pm$ 0,02	18,63 $\pm$ 0,07	18,83 $\pm$ 0,11	18,40 $\pm$ 0,11
Peso seco (g)	4,43 $\pm$ 0,18	4,30 $\pm$ 0,11	4,43 $\pm$ 0,06	4,52 $\pm$ 0,11	4,37 $\pm$ 0,03

A liofilização demonstrou uma homogeneidade nas microsferas dos consórcios de micro-organismos em alginato e quitosana, além de ser considerada uma das técnicas mais aplicáveis e eficientes para a conservação de micro-organismos, devido à garantia de alta viabilidade microbiana (cerca de 74%). Costa *et al.* (2000); Miyamoto-Shinohara *et al.* (2000) e Costa *et al.* (2009) também destacam que a liofilização é um método que garante alta viabilidade microbiana.

Após este processo de desidratação por meio da liofilização, as microsferas foram ressuspensas, sendo realizada a contagem de células nos tempos de: 0-12 horas (em intervalos de 2 horas), 24, 48 e 72 horas. Os dados obtidos foram apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Contagem de células (céls.mL<sup>-1</sup>) após inoculação das microesferas do consórcio de micro-organismos em meio mineral enriquecido em diferentes intervalos de tempo. R1 - Repetição um; R2 - Repetição dois; R3 - Repetição três.

Tempo	R1 (céls.mL <sup>-1</sup> )	R2 (céls.mL <sup>-1</sup> )	R3 (céls.mL <sup>-1</sup> )	Média céls.mL <sup>-1</sup>
0h	1,10 x 10 <sup>6</sup>	8,10 x 10 <sup>5</sup>	9,40 x 10 <sup>5</sup>	9,50 x 10 <sup>5</sup>
2h	1,23 x 10 <sup>6</sup>	1,66 x 10 <sup>6</sup>	1,60 x 10 <sup>6</sup>	1,50 x 10 <sup>6</sup>
4h	3,17 x 10 <sup>6</sup>	3,03 x 10 <sup>6</sup>	3,31 x 10 <sup>6</sup>	3,17 x 10 <sup>6</sup>
6h	7,35 x 10 <sup>6</sup>	6,79 x 10 <sup>6</sup>	6,64 x 10 <sup>6</sup>	6,93 x 10 <sup>6</sup>
8h	9,65 x 10 <sup>6</sup>	1,05 x 10 <sup>7</sup>	1,23 x 10 <sup>7</sup>	1,08 x 10 <sup>7</sup>
10h	1,40 x 10 <sup>7</sup>	1,78 x 10 <sup>7</sup>	2,14 x 10 <sup>7</sup>	1,77 x 10 <sup>7</sup>
12h	3,28 x 10 <sup>7</sup>	3,19 x 10 <sup>7</sup>	3,44 x 10 <sup>7</sup>	3,30 x 10 <sup>7</sup>
24h	3,51 x 10 <sup>8</sup>	3,34 x 10 <sup>8</sup>	3,40 x 10 <sup>8</sup>	3,42 x 10 <sup>8</sup>
48h	1,10 x 10 <sup>9</sup>	1,09 x 10 <sup>9</sup>	1,09 x 10 <sup>9</sup>	1,09 x 10 <sup>9</sup>
72h	2,80 x 10 <sup>9</sup>	2,89 x 10 <sup>9</sup>	2,95 x 10 <sup>9</sup>	2,88 x 10 <sup>9</sup>

De modo geral, observou-se um aumento gradativo da quantidade de células por mL ao longo dos intervalos de tempo analisados, variando entre 8,10 x 10<sup>5</sup> céls.mL<sup>-1</sup> no tempo zero (repetição 2) a 2,95 x 10<sup>9</sup> céls.mL<sup>-1</sup> no tempo 72 horas (repetição 3).

Em relação à ressuspensão das microesferas, verificou-se que estas iniciaram a liberação dos consórcios de micro-organismos no meio imediatamente após a sua rehidratação (tempo zero). Além disso, observou-se que após 72 horas de incubação, as microesferas mantiveram seus aspectos iniciais como, forma e tamanho.

Os resultados obtidos demonstram que a imobilização dos consórcios de micro-organismos em alginato com posterior revestimento de quitosana possibilita a liberação de micro-organismos no meio. Este é um aspecto fundamental em processos de biorremediação que envolvem a estratégia de bioaugmentação. Além disso, o uso de consórcios microbianos, permite uma otimização do processo, visto que, cada micro-organismo desempenha uma função durante a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo.

## Conclusões

Os micro-organismos, constituintes dos cinco consórcios, se desenvolveram utilizando o substrato (meio mineral enriquecido com extrato de levedura e glicerol), sem inibir completamente o crescimento dos demais, o que indica que estas bactérias podem atuar em

conjunto para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, por meio da complementariedade metabólica.

A utilização da biomassa dos consórcios bacterianos para a formação de microesferas é viável para a preservação, proteção e armazenamento de micro-organismos biodegradadores. Esta imobilização em microesferas de alginato e quitosana, raramente citada em outros trabalhos, apresentou-se como um método eficaz para a manutenção da viabilidade celular, permitindo a liberação dos micro-organismos no meio. Deste modo, a imobilização dos consórcios de micro-organismos em microesferas apresenta-se como uma forma inovadora de otimização do processo de biorremediação/bioaugmentação para o tratamento de ambientes contaminados com petróleo.

## Referências

Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE & Ehinomen I (2015) Biorremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *Inter J Environ Biorem Biodegrad* **3**: 28-39.

Aleixo LAG, Tachibana T & Casagrande D (2007) Poluição por petróleo - formas de introdução de petróleo e derivados no ambiente. *Integração* **13**: 159-166.

Al-Wasify R & Hamed SR (2014) Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *Inter J Bacteriol* **2014**: 1-8.

Amro MM (2004) Factors affecting chemical remediation of oil contaminated water-wetted soil. *Chem Eng Technol* **27**: 890-894.

Andrade JA, Augusto F & Jardim ICSF (2010) Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét Quím* **35**: 17-43.

Andreolli M, Lampis S, Zenaro E, Salkinoja-Salonen M & Vallini G (2011) Burkholderia fungorum DBT1: a promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. *FEMS Microbiol Lett* **319**: 11-18.

Angelim AL, Costa SP, Farias BCS, Aquino L & Melo VMM (2013) An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *J Environ Manage* **127**: 10-17.

Burgain J, Gaiani C, Linder M & Scher J (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Engineering* **104**: 467-483.

Buyukkamaci N & Kucukselek E (2007) Improvement of dewatering capacity of a petrochemical sludge. *J Hazard Mater* **144**: 323-327.

Carvalho TC (2006) *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo*. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Chen Y, Li C, Zhou Z, Wen J, You X, Mao Y, Lu C, Huo G & Jia X (2014) Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis. *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 3433- 3447.

Chen YM, Lin TF, Huang C, Lin JC & Hsieh FM (2007). Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *J Hazard Mater* **148**: 660- 670.

Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araujo SAC & Rolim BN (2009) Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal* **19**: 111-122.

Costa E, Usall J, Teixido N, Garcia N, Vinas I (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *J Appl Microbiol* **89**: 793-800.

Covizzi LG, Giese EC, Gomes E, Dekker RFH & Silva R (2007) Imobilização de células microbianas e suas aplicações tecnológicas. *Semina: Tech Ex* **28**: 143-160.

Cunningham SD, Anderson TA & Schwab AP (1996) Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv Agron* **56**: 55-114.

Da Cruz GF, Vasconcellos SP, Angolini CFF, Dellagnezze BM, Sierra Garcia IN, Oliveira VM, Santos Neto EV, Marsaioli AJ (2011) Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs. *AMB Express* **1**: 47-57.

Das N & Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* **2011**: 1-13.

Déziel E, Paquette G, Villemur G, Lépine F & Bisaillon JG (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microb* **62**: 1908-1912.

Estevinho BN, Damas AM, Martins P & Rocha F (2014) Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. *Food Res Inter* **64**: 134-140.

Falciglia PP, Giustra MG & Vagliasindi FGA (2011) Low-temperature thermal desorption of diesel-polluted soil: Influence of temperature and soil texture on contaminant removal kinetics. *J Hazard Mater* **185**: 392-400.

Farias V, Maranhão LT, Vasconcelos EC, Carvalho Filho MAS, Lacerda LG, Menegassi Azevedo JA, Pandey A & Soccol CR (2009) Phytodegradation potential of *Erythrina cristagalli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Appl Biochem Biotechnol* **157**: 10-22.

Faulwetter JL, Gagnon V, Sundberg C, Chazarenc F, Burr MD, Brisson J, Camper AK & Stein OR (2009) Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecol Eng* **35**: 987-1004.

- Frutos FJ, Pérez R, Escolano O, Rubio A, Gimeno A, Fernandez MD, Carbonell G, Perucha C & Laguna J (2012) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: Evaluation of bioremediation technologies. *J Hazard Mater* **199-200**: 262-271.
- Gallego JL, García-Martínez MJ, Llamas JF, Belloch C, Peláez AI & Sánchez J (2007) Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation* **18**: 269-281.
- Gan S, Lau EV & Ng HK (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater* **172**: 532–549.
- Gentili AR, Cubitto MA, Ferrero M & Rodríguez MS (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int Biodeterior Biodegradation* **57**: 222-228.
- Gerhardt KE, Huang X, Glick BR & Greenberg B (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* **176**: 20-30.
- Hans-Holgar L & Alexander M (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* **40**: 7-10.
- Herrero M & Stuckey DC (2015) Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere* **140**:119-128.
- Ighovie ES & Ikechukwu EE (2014) Phytoremediation of crude oil contaminated soil with *Axonopus compressus* in the Niger Delta region of Nigeria. *Nat Resour* **5**: 59-67.
- Inckot RC, Santos GO, Souza LA & Bona C (2011) Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora* **206**: 261-266.
- Jacques RJS, Bento FM, Antonioli ZI & Camargo FAO (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc Rural* **37**: 1192-1201.
- Juck D, Charles T, Whyte LG & Greer CW (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 241-249.
- Kamalian N, Mirhosseini H, Mustafa S & Manap MYA (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. *Carbohydr Polym* **111**: 700–706.
- Kumar G, Vijayakumar L, Joshi G, Peter DM, Dharani G & Kirubakaran R (2014) Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresour Technol* **170**: 556-564.
- Lee KY & Mooney DJ (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**: 106-126.

- Lin M, Liu Y, Chen W, Wang H & Hu X (2014) Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *Int Biodeterior Biodegradation* **88**: 8-12.
- Liu R, Jadeja RN, Zhou Q & Liu Z (2012) Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. *Environ Eng Sci* **29**: 494-501.
- Liu Y, Hu X & Liu H (2016) Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S. *Int Biodeterior Biodegradation* **107**: 56-61.
- Liu W, Sun J, Ding L, Luo Y, Chen M & Tang C (2013) Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). *Plant Soil* **371**: 533-542.
- Lopes A & Piedade MTF (2009) Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Poaceae) em solo de várzea contaminado com petróleo de Urucu. *Acta Amaz* **39**: 583-590.
- Luqueño F, Encinas VC, Marsch R, Martinez-Suarez C, Vazquez-Nunez E & Dendooven L (2011) Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: a review. *Environ Sci Pollut Res* **18**: 12-30.
- Macek T, Mackova M & Kas J (2000) Research review paper: exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv* **18**: 23-34.
- Magot M, Ollivier B, Patel BKC (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Leeuwenhoek* **77**: 103-116.
- Makkar RS & Cameotra SS (1998) Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biot* **20**: 48-52.
- Malik ZA & Ahmed S (2012) Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *Afr J Biotechnol* **11**: 650-658.
- Mao J, Luo Y, Teng Y & Li Z (2012) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *Int Biodeter Biodegr* **70**: 141-147.
- Mariano AP, Kataoka APAG, Angelis DF & Bonotto DM (2007) Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Braz J Microbiol* **38**: 346-353.
- McGuinness M & Dowling D (2009) Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. *Int J Environ Res Public Health* **6**: 2226-2247.
- Medina-Moreno SA, Huerta-Ochoa S & Gutiérrez-Rojas M (2005) Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil. *Can J Microbiol* **51**: 231-239.

- Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi, T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S & Komatsu Y (2000) Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* **41**: 251-255.
- Mohanty S, Jasmine J & Mukherji S (2013) Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. *BioMed Res Int* **2013**: 1-16.
- Molinos-Senante M, Gómez T, Caballero R, Hernández-Sancho F & Sala-Garrido R (2015). Assesment of wastewater treatment alternatives for small communities: An analytic network process approach. *Sci Total Environ* **532**: 676-687.
- Pereira ARB & Freitas DAF (2012) Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. *Revista Eletrônica Gest Educ Tecnol Ambient* **6**: 995-1006.
- Pillai CKS, Paul W & Sharma CP (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci* **34**: 641-678.
- Sangabriel W, Ferrera-Cerrato R, Trejo-Aguilar D, Mendonza-López MR, Cruz-Sanchez JS, Lopez-Ortiz C, Delgadillo-Martinez J & Alarcón, A (2006) Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev Int Contam Ambie* **22**: 63-73.
- Santo EFE, Lima LKF, Torres APC, Oliveira G & Ponsano EHG (2013) Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. *Food Sci Technol* **33**: 47-51.
- Singh R, Singh P & Sharma R (2014) Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. *Proc Inter Acad Ecol Environ Sci* **4**: 1-6.
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR & Christensen JH (2010) Phytoremediation of na aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* **81**: 1084-1090.
- Speight JG & Arjoon KK (2012) *Biorremediation of Petroleum and Petroleum products*.
- Speight JG (2014) *The Chemistry and Technology of Petroleum*.
- Terratherm A (2003) Demonstration of In Situ Thermal Desorption Thermal Blankets and Wells. *TerraTherm Environ Serv* **1**: 01-04.
- Thapa B, KC AK & Ghimbire A (2012) A review on Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *KUSET* **8**: 164-170.
- Tiburtius ERL, Peralta-Zamora P & Leal ES (2004) Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Quim Nova* **27**: 441-446.
- Tran VT, Benoit JP & Venier-Julienne MC (2011) Why and how to prepare biodegradable monodispersed polymeric microparticles in the field of pharmacy? *Inter J Pharm* **407**: 1-11.



Ururahy AFP, Pereira NJ & Marins MDM (1998) Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. *Boletim Técnico da Petrobrás* **41**: 125-132.

Wang ZY, Xu Y, Wang HY, Zhao J, Gao DM, Li FM & Xing B (2012). Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere* **22**: 717-725.

Weber BD & Santos AA (2013) Utilização de biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. *EA* **10**: 114-133.

Xiao C & Sun F (2013) Fabrication of distilled water-soluble chitosan/alginate functional multilayer composite microspheres. *Carbohydr Polym* **98**: 1366-1370.

Zhong Y, Luan T, Lin L, Liu H & Tam NFY (2011) Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. *Bioresour Technol* **102**: 2965-2972.

## 6 CONCLUSÕES

A biorremediação, quando comparada à maioria dos métodos de tratamento químicos e físicos, destaca-se como uma técnica eficiente, sustentável e promissora, que congrega aspectos econômicos, ecológicos e sociais. Por meio da utilização de micro-organismos, presentes na rizosfera de plantas fitorremediadoras, ocorre a degradação dos contaminantes (rizodegradação) e a consequente remediação de ambientes contaminados com petróleo. Neste processo, a rizosfera possui um papel ecológico muito importante, visto que propicia o desenvolvimento destes micro-organismos por meio da liberação de oxigênio e exsudatos. Deste modo, ressalta-se a importância da bioprospecção de micro-organismos rizosféricos, autóctones, não patogênicos e resistentes ao contaminante, com a finalidade de obter-se os agentes degradadores do próprio local e/ou da rizosfera de plantas fitorremediadoras, que podem ser utilizados em processos de biorremediação de locais contaminados com petróleo.

Estes micro-organismos rizosféricos, com capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, podem ser combinados na forma de consórcios, a fim de que, por meio da cooperação sinérgica e complementariedade metabólica entre espécies de micro-organismos, os diversos componentes do petróleo possam ser mineralizados. Além disso, esses consórcios microbianos podem ser imobilizados em suportes baseados em polímeros naturais, como alginato e quitosana. Esta imobilização permite a preservação das características morfofisiológicas, evitando a competição natural com os micro-organismos indígenas, protegendo-os contra a toxicidade do contaminante e permitindo uma liberação contínua dos micro-organismos no meio. Ressalta-se, deste modo, a importância de novas pesquisas para o estabelecimento e imobilização de consórcios de micro-organismos degradadores de petróleo, como forma de otimização da técnica de biorremediação de locais contaminados.

Neste sentido, sete bactérias (*Bacillus* sp.<sup>1</sup>, *Bacillus* sp.<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp.<sup>3</sup>, *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp.<sup>4</sup> e *Bacillus* sp.<sup>5</sup>) extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras foram constatadas, na presente pesquisa, como produtoras de biossurfactante e demonstraram-se tolerantes e eficientes quanto à degradação de petróleo, uma vez que se desenvolveram em meio, em que o petróleo foi utilizado como única fonte de carbono, analisado em relação a diferentes parâmetros. *Microbacterium* sp. e *Stenotrophomonas* sp. apresentaram-se como as mais eficientes para a degradação dos compostos de petróleo em 24 e 48 horas, respectivamente. Observou-se também que os parâmetros condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, biomassa microbiana e densidade óptica, indicam a ocorrência de

biodegradação, destacando a importância da verificação de tais variáveis em processos de biorremediação.

Estas sete bactérias, quando associadas em consórcios, demonstraram-se eficientes para degradação, visto que se desenvolveram utilizando o substrato (meio mineral enriquecido com extrato de levedura e glicerol), sem interferir completamente no crescimento dos demais micro-organismos constituintes. Verificou-se que as microesferas, obtidas a partir da imobilização desses consórcios em alginato e quitosana, apresentaram alta viabilidade celular, iniciando a liberação dos micro-organismos, quando ressuspensas, no tempo zero. Os resultados obtidos demonstram que a utilização de biomassa dos consórcios para a formação de microesferas é um processo viável para a preservação e o armazenamento microbiano e a utilização de alginato e quitosana como matrizes, pouco citadas em outras pesquisas, é uma forma inovadora de otimizar o processo de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

### 6.1 Sugestões

A seguir são apresentadas algumas sugestões de trabalhos que poderão ser realizados para suprir algumas deficiências que foram constatadas durante o desenvolvimento do presente estudo:

- 1) Teste de produção de quitosanase pelas sete bactérias extraídas da rizosfera de plantas fitorremediadoras, para verificação do potencial de quebra do polímero quitosana.
- 2) Microscopia eletrônica das microesferas para estudo sobre o rompimento das matrizes poliméricas e liberação dos consórcios de micro-organismos.
- 3) Estudos aprofundados sobre o tempo de liberação dos consórcios de micro-organismos pelas microesferas de alginato e quitosana.
- 4) Estudos de bioaugmentação em solos contaminados com petróleo, para verificação da ação destas microesferas de consórcios bacterianos na degradação de contaminantes.
- 5) Estudos moleculares com as bactérias com a finalidade de descobrir gene ou genes responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.O.; FUFUYIN, P.T.; OKORO, S.E.; EHNOMEN, I. Biorremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, p. 28-39, 2015.
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA. **Key word energy statistics**, 2013.
- AKPOVETA, O.V.; EGHAREVBA, F.; MEDJOR, O.W. A pilot study on the biodegradation of hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. **International Journal of Environmental Science**, v. 8, p. 54-67, 2011.
- ALEIXO, L.A.G.; TACHIBANA, T.; CASAGRANDE, D. Poluição por petróleo - formas de introdução de petróleo e derivados no ambiente. **Integração**, v. 13, p. 159-166, 2007.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and biorremediation**. Academic Press, 2ª ed. San Diego, USA, 1999. 239p.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p. 869-881, 2013.
- ALMEDA, R.; CONNELLY, T.R.; BUSKEY, E.J. Novel insight into the role of heterotrophic dinoflagellates in the fate of crude oil in the sea. **Scientific Reports**, v. 4, p. 01-09, 2014.
- AL-WASIFY, R.; HAMED, S.R. Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. **International Journal of Bacteriology**, v. 2014, p.1-8, 2014.
- AMRO, M.M. Factors affecting chemical remediation of oil contaminated water-wetted soil. **Chemical Engineering & Technology**, v. 27, p. 890-894, 2004b.
- AMRO, M.M. Treatment techniques of oil-contaminated soil and water aquifers. **International Conference on Water Resources & Arid Environment**, 2004a.
- 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.
- ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; ZENARO, E.; SALKINOJA-SALONEN, M.; VALLINI, G. *Burkholderia fungorum* DBT1: a promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 319, p. 11-18, 2011.
- ANGELIM, A.L.; COSTA, S.P.; FARIAS, B.C.S.; AQUINO, L.F.; MELO, V.M.M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal Environmental Management**, v. 127, p. 10-17, 2013.
- ARIAS, M.E.; GONZÁLEZ-PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ-VILA, F.J.; BALL, A.S. Soil health - a new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, v. 8, p. 13-21, 2005.

ATAGANA, H.I. Bioremediation of co-contamination of crude oil and heavy metals in soil by phytoremediation using *Chromolaena odorata* (L) King & H.E. Robinson. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 215, p. 261-271, 2011.

ATEKWANA, E.A.; WERKEMA, D.D.; DURIS, J.W.; ROSSBACH, S.; ATEKWANA, E.A.; SAUCK, W.A.; CASSIDY, D.P.; MEANS, J.; LEGALL, F.D. *In-situ* apparent conductivity measurements and microbial population distribution at a hydrocarbon-contaminated site. **Geophysics**, v. 69, p. 56-63, 2004.

BACOSA, H.P.; INOUE, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 689-697, 2015.

BALACHANDRAN, C.; DURAI PANDIYAN, V.; BALAKRISHNA, K.; IGNACIMUTHU, S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 83-90, 2012.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 723-736, 2005.

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.

BANERJEE, A.; GHOSHAL, A.K. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 65, p. 1052-1060, 2011.

BANKOVIĆ-ILIĆ, I.B.; STAMENKOVIĆ, O.S.; VELJKOVIĆ, V.B. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3621-3647, 2012.

BAZOT, S.; LEBEAU, T. Effect of immobilization of a bacterial consortium on diuron dissipation and community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4257-4261, 2009.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 65-68, 2003.

BOON, N.; DE GELDER, L.; LIEVENS, H.; SICILIANO, S.; TOP, E.; VERSTRAETE, W. Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-chloroaniline by a slow release approach. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 4698-4704, 2002.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

BRAKSTAD, O.G.; FAKSNESS, L.G.; MELBYE, A.G. Depletion of compounds from thin oil films in seawater. **Proceedings of the twenty-fifth arctic and marine oil spill program (AMOP)**, v. 33, p. 921-940, 2002.

BRAMLEY-ALVES, J.; WASLEY, J.; KING, C.K.; POWELL, S.; ROBINSON, S.A. Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: An effective management option. **Journal of Environmental Management**, v. 142, p. 60-69, 2014.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, p. 467-483, 2011.

BUYUKKAMACI, N.; KUCUKSELEK, E. Improvement of dewatering capacity of a petrochemical sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, p. 323-327, 2007.

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

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

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

CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J.C.C.; DIAS-BRITO, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2, p. 1-12, 2007.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K.C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 207-228, 2009.

CAPPUYNS, V. Environmental impacts of soil remediation activities: quantitative and qualitative tools applied on three case studies. **Journal of Cleaner Production**, v. 52, p. 145-154, 2013.

CARVALHO, T.C. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

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

CHANEAU, C.H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J.F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 144, p. 419-440, 2013.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395-400, 2005.

CHEN, H.J.; GUO, G.L.; TSENG, D.H.; CHENG, C.L., HUANG, S.L. Growth factors, kinetics and biodegradation mechanism associated with *Pseudomonas nitroreducens* TX1 grown on octylphenol polyethoxylates. **Journal of Environmental Management**, v. 80, p. 79-286, 2006.

CHEN, J.; WONG, M.H.; WONG, Y.S & TAM NFY. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 695-702, 2008.

CHEN, Y.; LI, C.; ZHOU, Z.; WEN, J.; YOU, X.; MAO, Y.; LU, C.; HUO, G.; JIA, X. Enhanced biodegradation of alkane hydrocarbons and crude oil by mixed strains and bacterial community analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3433- 3447, 2014.

CHEN, Y.M.; LIN, T.F.; HUANG, C.; LIN, J.C.; HSIEH, F.M. Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. **Journal Hazardous Materials**, v. 148, p. 660- 670, 2007.

CHENG, H.H.; MULLA, D.J. The soil environment. In: Adriano DC. **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA. Cap 1, 1-13, 1999.

COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. **MATRIZ ENERGÉTICA: Cenários, Oportunidades e Desafios CNI**. Brasília: Confederação Nacional da Indústria - CNI, 2007.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; GARCIA, N.; VINAS, I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 793-800, 2000.

COSTA, E.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; ARAUJO, S.A.C.; ROLIM, B.N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, p. 111-122, 2009.

COSTA, A.F.S.; SILVA, J.R.R.; SANTOS, R.C.M.M.; FARIAS, C.B.B.; SARRUBO, L.A.; JORDÃO, R.C.C.; SALGUEIRO, A.A. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Centro de Ciências e Tecnologia**, v. 1, p. 1-7, 2007.

COUTINHO, H.D.; BARBOSA, A.R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, p. 103-117, 2007.

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações tecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 32-37, 2002.

CUNNINGHAM, S.D.; ANDERSON, T.A.; SCHWAB, A.P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 55-114, 1996a.

CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and perspectives of phytoremediation. **Plant Physiology**, v. 110, p. 715-719, 1996b.

DA CRUZ, G.F.; VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.F.; DELLAGNEZZE, B.M.; SIERRA GARCIA, I.N.; OLIVEIRA, V.M.; SANTOS NETO, E.V.; MARSAIOLI, A.J. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs. **AMB Express**, v. 1, p. 47-57, 2011.

DANTAS, J.S.; SOUZA, A.P.; FARIAS, M.F.; NOGUEIRA, V.F.B. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, p. 213-218, 2009.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

DELLAGNEZZE, B.M.; SOUSA, G.V.; MARTINS, L.L.; DOMINGOS, D.F.; LIMACHE, E.E.G.; VASCONCELLOS, S.P.; CRUZ, G.F.; OLIVEIRA, V.M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, p. 191-200, 2014.

DENG, M.; LI, J.; LIANG, F.; MEISHENG, Y.; XU, X.; YUANG, J.; PENG, J.; WU, C.; WANG, J. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 83, p. 79-86, 2014.

DEON, M.C.; DEROSI, A.; DAL'MAGRO, C.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 73-82, 2012.

DÉZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, G.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J.G. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1908-1912, 1996.

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

DINDAR, E.; SAGBAN, F.O.T.; BASKAYA, H.S. Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil. **Journal of Environmental Biology Science**, v. 19, p. 39-47, 2013.

DONG, Z.Y.; HUANG, W.H.; XING, D.F.; ZHANG, H.F. Remediation of soil co-contaminated with petroleum and heavy metals by the integration of electrokinetics and biostimulation. **Journal Hazardous Materials**, v. 260, p. 399-408, 2013.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 143-152, 2002.

EL FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268-275, 2005.

ELNASHAR, M.M.M. The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology. In: ELNASHAR, M.M.M. (Ed.), **Biotechnology of Biopolymers**, v. 2011, p. 3-32, 2011.



EPA. **Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons**. 1-171, 2006.

EPA: Environmental Protection Agency. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers**. Chapter II – Soil Vapor Extraction, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 e EPA 510-R-04-002, 2004. 36 p.

ESCALANTE-ESPINOSA, E.; GALLEGOS-MARTINEZ, M.E.; FAVELA- TORRES, E.; GUTIERREZ-ROJAS, M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere**, v. 59, p. 405-413, 2005.

ESTEVINHO, B.N.; DAMAS, A.M.; MARTINS, P.; ROCHA, F. Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. **Food Research International**, v. 64, p.134-140, 2014.

FALCIGLIA, P.P.; GIUSTRA, M.G.; VAGLIASINDI, F.G.A. Low-temperature thermal desorption of diesel-polluted soil: Influence of temperature and soil texture on contaminant removal kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 392-400, 2011.

FARIAS, V.; MARANHO, L.T.; VASCONCELOS, E.C.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; LACERDA, L.G.; MENEGASSI AZEVEDO, J.A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Phytodegradation Potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in Petroleum-Contaminated Soil. Petroleum-Contaminated Soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 10-22, 2009.

FAULWETTER, J.L.; GAGNON, V., SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M.D.; BRISSON, J.; CAMPER, A.K.; STEIN, O.R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. **Ecological Engineering**, v. 35, p. 987-1004, 2009.

FERRERA-CERRATO, R.; ALARCON, A.; MENDONZA-LOPEZ, M.R.; SANGABRIEL, W.; TREJO-AGUILLAR, D.; CRUZ-SANCHEZ, S.; LOPEZ-ORTIS, C.; DELGADILLO-MARTINEZ, J. Fitorremediación de um suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. **Agrociência**, v. 41, p. 817-826, 2007.

FERRERA-CERRATO, R.; ROJAS-AVELIZAPA, N.G.; POGGI-VARALDO, H.M., ALÁRCÓN, A.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 48, p. 179-187, 2006.

FINOTTI, A.R.; CAICEDO, N.O. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação Brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 6, p. 29-46, 2001.

FRICK, C.M.; FARREL, R.E.; GERMIDA, J.J. **Assessment of Phytoremediation as an In-Situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites**. University of Saskatchewan (Department of Soil Science)- Canadá, 1999.

FRUTOS, F.J.; PÉREZ, R.; ESCOLANO, O.; RUBIO, A.; GIMENO, A.; FERNANDEZ, M.D.; CARBONELL, G.; PERUCHA, C.; LAGUNA, J. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: Evaluation of bioremediation technologies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 262-271, 2012.

GALLEGO, J.L.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M.J.; 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.

GAN, S.; LAU, E.V.; NG, H.K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 532-549, 2009.

GAO, X.; GAO, W.; CUI, Z.; HAN, B.; YANG, P.; SUN, C.; ZHENG, L. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, p. 373-380, 2015.

GAYLARD, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 8, p. 36-43, 2005.

GAYLARDE, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 1999.

GENTILI, A.R.; CUBITTO, M.A.; FERRERO, M.; RODRIGUÉZ, M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 57, p. 222-228, 2006.

GERHARDT, K.E.; HUANG, X.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. **Plant Science**, v. 176, p. 20-30, 2009.

GOGOI, B.K.; DUTTA, N.N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHAN, T.R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 767-782, 2003.

GOMES, R.V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. (Dissertação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GONÇALVES, A.; GRANZIERA, M.L.M. **Petróleo, gás e meio ambiente**. Santos: Editora Universitária Leopoldianum, 2012. 195p.

GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M.C.; BAUTISTA, L.F.; DELGADO, L.; VILLA, J.A. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the -bacterial community during the process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9438-9446, 2011.

GUEDES, C.L.B.; CORRER, C.J.; LOBO, I.; ABI-SAAB, O.J.G. Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, p. 87-100, 2010.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a Review. **Separation and Purification**, v. 38, p. 43-74, 2004.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 71-109, 2005.

HA, J.; ENGLER, C.R.; WILD, J.R. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1138-1142, 2009.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and Bioestimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, p. 1926-1935, 2007.

HAMZAH, A.; RABU, A.; AZMY, R.F.H.R.; YUSSOFF, N.A. Isolation and Characterization of Bacteria Degrading Sumandak and South Angsi Oils. **Sains Malaysia**, v. 39, p. 161-168, 2010.

HANS-HOLGAR, L.; ALEXANDER, M. Plant-promoted pyrene degradation in soil. **Chemosphere**, v. 40, p. 7-10, 2000.

HARMON, T.C.; BURKS, G.A.; AYCAGUER, A.C.; JACKSON, J. Thermally enhanced vapour extraction for removing PAHs from lampblack-contaminated soil. **Journal of Environmental Engineering**, v. 127, p. 986-993, 2001.

HASSANSHAHIAN, M.; AHMADINEJAD, M.; TEBYANIAN, H.; KARIMINIK, A. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). **Marine Pollution Bulletin**, v. 73, p. 300-305, 2013.

HASSANSHAHIAN, M.; ZEYNALIPOUR, M.S.; MUSA, F.H. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). **Marine Pollution Bulletin**, v. 82, p. 39-44, 2014.

HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 343-355, 1999.

HERRERO, M.; STUCKEY, D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, v. 140, p. 119-128, 2015.

HOU, S.S.; KO, Y.C.; LIN, T.H. Study on incineration technology of oil gas generated during the recovery process of oil spill. **Energy Conversion & Management**, v. 52, p. 1662-1668, 2011.

HUGUENOT, D.; MOUSSET, E.; VAN HULLEBUSCH, E.D.; OTURAN, M.A. Combination of surfactant enhanced soil washing and electro-Fenton process for the treatment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons. **Journal of Environmental Management**, v. 153, p. 40-47, 2015.

HUTCHINSON, S.L.; BANKS, M.K.; SHWAB, A.P. Phytoremediation of age petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 395-403, 2001.

HSIEH, F.M.; HUANG, C.; LIN, T.F.; CHEN, Y.M.; LIN, J.C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 83-92, 2008.

IGHOVIE, E.S.; IKECHUKWU, E.E. Phytoremediation of crude oil contaminated soil with *Axonopus compressus* in the Niger Delta region of Nigeria. **Natural Resources**, v. 5, p. 59-67, 2014.

INCKOT, R.C.; SANTOS, G.O.; SOUZA, L.A.; BONA, C. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. **Flora - Morphology, Distribution, Functional, Ecology of Plants**, v. 206, p. 261-266, 2011.

JACQUES, R.J.S.; SILVA K.J.; BENTO F.M.; CAMARGO F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 310-317, 2010.

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.

JAIN, D.K.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; LEE, H.; TREVORS, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 271-279, 1991.

JANBANDHU, A.; FULEKAR, M.H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 333-340, 2011.

JASMINE, J.; MUKHERJI, S. Characterization of oily sludge from a refinery and biodegradability assessment using various hydrocarbon degrading strains and reconstituted consortia. **Journal Environmental Management**, v. 149, p. 118-125, 2015.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 241-249, 2000.

JUNTER, G.A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 633-658, 2004.

KAIMI, E. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 110-119, 2006.

KAMALIAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; MUSTAFA, S.; MANAP, M.Y.A. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 700-706, 2014.

KARIMA, A.H.; BADAWI, A.M.; FAHD, M.I.; NOUR, M.H. Enhancement of Egyptian crude oil bioremediation using bacterial mutants. **Egyptian Journal**, v. 4, p. 45-60, 1995.

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

KISIC, I.; MESIC, S.; BASIC, F.; BRKIC, V.; MESIC, M.; DURN, G.; ZGORELEC, Z.; BERTOVIC, L. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. **Geoderma**, v. 149, p. 209-216, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E.L.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 6-15, 2004.

KUMAR G; VIJAYAKUMAR, L.; JOSHI, G.; PETER, D.M.; DHARANI, G.; KIRUBAGARAN, R. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 556-564, 2014.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.

LAI, C.; HUANG, Y.C.; WEI Y.; CHANG, J. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 609-614, 2009.

LANDMEYER, J. E. **Introduction to phytoremediation of contaminated groundwater: Historical foundation, hydrologic control, and contaminant remediation**. New York: Springer, 2011, 460 p.

LEE, K.Y.; MOONEY, D J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106-126, 2012.

LEE, J.J.; PARK, D.; KIM, B.U.; DONG, J.I.; LEE, S. Remediation of petroleum-contaminated soils by fluidized thermal desorption. **Waste Management**, v. 18, p. 503-507, 1998.

LEE, S.; KA, J.O.; GYU, S.H. Growth promotion of *Xanthium italicum* by application of rhizobacterial isolates of *Bacillus aryabhatai* in microcosm soil. **Journal of Microbiology**, v. 50, p. 45-49, 2012.

LI, X.; RUI, J.; MAO, Y.; YANNARELL, A.; MACKIE, R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 392-401, 2014.

LIANG, Y.; ZHANG, X.; DAI, D.; LI, G. Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 80-87, 2009.

LIN, M.; LIU, Y.; CHEN, W.; WANG, H.; HU, X. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 88, p. 8-12, 2014.

LIU, B.; LI, X.; LI, Z.; SUI, H.; LI, H. Fluidized countercurrent solvent extraction of oil pollutants from contaminated soil. Part 1: Fluid mechanics. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 501-507, 2015.

LIU, R.; JADEJA, R.N.; ZHOU, Q.; LIU, Z. Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. **Environmental Engineering Science**, v. 29, p. 494-501, 2012.

LIU, W.; SUN, J.; DING, L.; LUO, Y.; CHEN, M.; TANG, C. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). **Plant Soil**, v. 371, p. 533-542, 2013.

LIU, H.; YAO, J.; YUAN, Z.; SHANG, Y.; CHEN, H.; WANG, F.; MASAKORALA, K.; YU, C.; CAI, M.; BLAKE, R.E.; CHOI, M.M.F. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 87, p. 52-59, 2014.

LIU, Y., Hu, X.; Liu, H. Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 107, p. 56-61, 2016.

LOPES, A.; PIEDADE, M.T.F. Estabelecimento de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock (Poaceae) em solo de várzea contaminado com petróleo de Urucu. **Acta Amazônica**, v. 39, p. 583-590, 2009.

LOTFINASABASL, S.; GUNALE, V.R.; RAJURKAR, N.S. Petroleum Hydrocarbons Pollution in Soil and its Bioaccumulation in mangrove species, *Avicennia marina* from Alibug Mangrove Ecosystem, Maharashtra, India. **International Journal of Advancements in Research & Technology**, v. 2, p. 1-7, 2013.

LUQUEÑO, F.; ENCINAS, V.C.; MARSCH, R.; MARTINEZ-SUAREZ, C.; VAZQUEZ-NUNEZ, E.; DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 12-30, 2011.

MA, B.; HE, Y.; CHEN, H.H.; XU, J.M. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 855-861, 2009.

MACEK, T.; MACKOVA, M.; KAS, J. Research review paper: exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 23-34, 2000.

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

MAHANTY, B.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V.V. Batch biodegradation of PAHs in mixture by *Mycobacterium frederiksbergense*: analysis of main and interaction effects. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 12, p. 441-447, 2010.

MAKADIA, T.H.; ADETUTU, E.M.; SIMONS, K.L.; JARDINE, D.; SHEPPARD, P.J.; BALL, A.S. Re-use of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 866-871, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

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.

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.

MAO, J.; LUO, Y.; TENG, Y.; LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 70, p. 141-147, 2012.

MAQBOOL, F.; WANGA, Z.; XU, Y.; ZHAO, J.; GAO, D.; ZHAO, Y.; BHATTID, Z.A.; XING, B. Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. **Journal of Hazardous Materials**, v. 237-238, p. 262-269, 2012.

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.

MARÍN, J.A.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. **Biodegradation**, v. 17, p. 251-261, 2006.

MCCUTCHEON, S.C.; SCHONOR, J.L. **Phytoremediation: transformation and control of contaminants**. John Wiley & Sons (Eds.). New Jersey, 2003.

MCGUINNESS, M.; DOWLING, D. Plant-Associated Bacterial Degradation of Toxic Organic Compounds in Soil. **Internacional Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 2226-2247, 2009.

MEDINA-MORENO, S.A.; HUERTA-OCHOA, S.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 231-239, 2005.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environmental International** v. 37, p. 1362-1375, 2011.

MEI, H.; YIN, Y. Studies on marine oil spills and their ecological damage. **Journal of Ocean University of China**, v. 8, p. 312-316, 2009.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J.M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 634-663, 2013.

MÉNDEZ-NATERA, J.; SALAZAR-GARANTÓN, R.; VELÁSQUEZ, A. Efecto del derrame petrolero simulado y la aplicación de un remediador sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas em algodón (*Gossypium hirsutum* L.) y quinchocho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). **Revista Tecnológica ESPOL**, v. 20, p. 209-214, 2007.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 165, p. 195-209, 2005.

MERTENS, B.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Slow-release inoculation allows sustained biodegradation of c-hexachlorocyclohexane. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 72, p. 622-627, 2006.

MEYER, D.D.; BEKER, S.A.; BÜCKER, F.; PERALBA, M.C.R.; FRAZZON, A.P.G.; OSTI, J.F.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 356-363, 2014.

MICHEL, J.; HENRY, C.B.; THUMM, S. Shoreline assessment and environmental impacts from the M/T Westchester oil spill in the Mississippi River. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 7, p. 155-161, 2002.

MISHRA, S.; SARMA, P.M.; LAL, B. Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosmo. **FEMS Microbiology Letters**, v. 235, p. 323-331, 2004.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; Komatsu, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.

MOHANTY, S.; JASMINE, J.; MUKHERJI, S. Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-16, 2013.

MOLINOS-SENANTE, M.; GÓMEZ, T.; CABALLERO, R.; HERNÁNDEZ-SANCHO, F.; SALA-GARRIDO, R. Assesment of wastewater treatment alternatives for small communities: An analytic network process approach. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 676-687, 2015.

MOLLAEI, M.; ABDOLLAHPOUR, S.; ATASHGAHI, S.; ABBASI, H.; MASOOMI, F.; RAD, I.; LOTFI, A.S.; ZAHIRI, H.S.; VALI, H.; NOGHABI, K.A. Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gainging insight into the novel single and hybrid immobilizations. **Journal Hazardous Materials**, v. 175, p. 284-292, 2010.



MOREIRA, I.T.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; TRIGUIS, J.A.; QUEIROZ, A.F.S.; BARBOSA, R.M.; ANJOS, J.A.S.A.; REYES, C.Y.; SILVA, C.S.; TRINDADE, M.C.L.F.; RIOS, M.C. Evaluation of the effects of metals on biodegradation of total petroleum hydrocarbons. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 215-220, 2013.

MOSCOSO, F.; TEIJIZ, I.; DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A. Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 270-276, 2012.

MPHEKGO, P.M.; CLOETE, T.E. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? **Environmental Science and Bio/Technology**, v. 3, p. 349-360, 2004.

NAIK, M.G.; DURAPHE, M.D. Review paper on - parameters affecting bioremediation. **International Journal of Life Science and Pharma Research**, v. 22, p. 77-80, 2012.

NAKATANI, A.S.; SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F.S.; LAMBAIS, M.R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "Landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1501-1512, 2008.

NASCIMENTO, C.A.O.; MORO, L.F.L. Petróleo: energia do presente, matéria-prima do futuro? **Revista de Estudos Avançados**, v. 89, p. 90-97, 2011.

NIE, M.; WANG, Y.; YU, J.; XIAO, M.; YANG, J.; FANG, C.; CHEN, J.; LI, B. Understanding Plant-Microbe Interactions for Phytoremediation of Petroleum-Polluted Soil. **Plos One**, v. 6, p. 1-8, 2011.

NWINYI, O.C.; NWODO, C.S.; AMUND, O.O. Biodegradation potential of two *Rhodococcus* strains capable of utilizing aniline as carbon source in tropical ecosystem. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 99-104, 2008.

OH, Y.S.; MAENG, J.; KIM, S.J. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 418-423, 2000.

OMOTAYO, A.E.; OJO, O.Y.; AMUND, O.O. Crude oil degradation by microorganisms in soils composts. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, p. 209-218, 2012.

ONWURAH, I.N.E.; OGUGUA, V.N.; ONYIKE, N.B.; OCHONOGOR, A.E.; OTITOJU, O.F. Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies. **International Journal of Environmental Research**, v. 1, p. 307-320, 2007.

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.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; POLIWODA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1

strain as a potential tool for bioremediation of petroleum contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 9385-9395, 2014.

PANDEY, J.; CHAUHAN, A.; JAIN, R.K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, p. 324-375, 2009.

PASUMARTHI, R.; CHANDRASEKARAN, S.; MUTNURI, S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 76, p. 276-282, 2013.

PATIL, N.K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.H.; NAYAK, S.A.; KAREGOUDAR, T.B. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. Immobilized cells in alginate and polyurethane. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 57, p. 82-87, 2006.

PAULA, A.M.; SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de "landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 448-455, 2005.

PEREIRA, A.R.B.; FREITAS, D.A.F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, p. 995-1006, 2012.

PERELO, L. W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 81-89, 2010.

PEZESHKI, S.R.; HESTER, M.W.; LIN, Q.; NYMAN, J.A. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 129-139, 2000.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

PILON-SMITS, E.A.H. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 15-39, 2005.

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.A.; PROCÓPIO, S.O.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 21, p. 335-341, 2003.

PONTES, J.; MUCHA, A.P.; SANTOS, H.; REIS, I.; BORDALO, A.; BASTO, M.C.; BERNABEU, A.; ALMEIDA, C.M.R. Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 76, p. 258-265, 2013.

POTHULURI, V.J.; CERNIGLIA, E.C. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R.G Chaudry (ed.). **Biological Degradation and Biorremediation of Toxic Chemicals**. Dioscorides. Portland, p. 92-123, 1994.

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, p. 63-77, 2014.

PRATHIBA, J.G.; KEERTHI, K.; DESHPANDE, A.; BHATTACHARYA, S.; PRIYADARSINI, R.I. Molecular identification of the isolated diesel degrading bacteria and optimization studies. **Journal of Biochemical Technology**, v. 5, p. 727-730, 2014.

QUEK, E.; TING, Y.P.; TAN, H.M. *Rhodococcus* sp F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 32-38, 2005.

RAHMAN, K.S.M.; BANAT, I.M.; THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 25-32, 2002.

RAMOS, D.T.; MARANHO, L.T.; GODOI, A.F.L.; CARVALHO FILHO, M.A.S.; LACERDA, L.G.; VASCONCELOS, E.C. Petroleum hydrocarbons rhizodegradation by *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. SM & Downs. **Water, Air & Soil Pollution: Focus**, v. 9, p. 293-302, 2009.

RANI, R.; JUWARKAR, A. Biodegradation of phorate in soil and rhizosphere of Brassica juncea (L.) (Indian Mustard) by a microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 71, p. 36-42, 2012.

RISDON, G.C.; POLLARD, S.J.T.; BRASSINGTON, K.J.; MCEWAN, J.N.; PATON, G.I.; SEMPLE, K.T.; COULON, F. Development of an analytical procedure for weathered hydrocarbon contaminated soils within a UK risk-based framework. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 7090-7096, 2008.

RIVERA-CRUZ, M.C.; FERRERA-CERRATO, R.R.; HALLER, V.V.; VÁZQUEZ, R.R.; LINARES, L.F. Adaptacion y seleccion de microorganismos autoctonos en Medios de cultivos enriquecidos con petroleo crudo. **Agrociencia**, v. 20, p. 423-434, 2001.

RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U.; SANTOS, R.L.C.; SOBRAL, L.G.S. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. Série Tecnologia Ambiental, Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. 76 p.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; CARDOSO, A.A. **Introdução à Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Brookman, 2010. 256 p.

ROCK, S.A. Field Evaluations of Phytotechnologies. In: MCCUTCHEON, S.C.; SCHNOOR, J.L. (2003). **Phytorremediation: Transformation and Control of Contaminants**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 987 p.

ROY, S.; DIPAK, H.; DEBABRATA, B.; DIPAK, B.; RANAJIT, K. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 575-581, 2002.

RUBERTO, L.A.M.; VAZQUEZ, S.C.; CURTOSI, A.; MESTRE, M.C. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. **Bioremediation Journal**, v. 10, p. 191-201, 2006.

SABIR, M.; WARAICH, E. A.; HAKEEM, K. R.; OZTURK, M.; AHMAD, H. R.; SHAHID, M. Phytoremediation: Mechanisms and Adaptations. **Soil Remediation and plants**. v. 1, p. 85-105, 2015.

SANGABRIEL, W.; FERRERA-CERRATO, R.; TREJO-AGUILAR, D.; MENDONZA-LÓPEZ, M.R.; CRUZ-SANCHEZ, J.S.; LOPEZ-ORTIZ, C.; DELGADILLO-MARTINEZ, J.; ALARCÓN, A. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 22, p. 63-73, 2006.

SANTO, E.F.E.; LIMA, L.K.F.; TORRES, A.P.C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E.H.G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 47-51, 2013.

SANTOS, C.F.; NOVAK, E. Plantas nativas do Cerrado e possibilidades em fitorremediação. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 7, p. 67-78, 2013.

SANTOS, G.C.G.; RODELLA, A.A. Efeito da adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico de B, Zn, Cu, Mn e Pb no cultivo de *Brassica juncea*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 793-804, 2007.

SANTOS, H.F.; CARMO, F.L.; CURY, J.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. 18S rDNA sequences from microeukaryotes reveal oil indicators in mangrove sediment. **Plos One**, v. 5, p. 1-8, 2010.

SCHWAB, A.P.; SU, J.; WETZEL, S.; PEKAREK, S.; BANKS, K.M. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 1940-1945, 1999.

SCULLION, J. Remediating polluted soils. **Naturwissenschaften**, v. 93, p. 51-65, 2006.

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

SHIRDAM, R.; ZAND, A.D.; BIDHENDI, G.N.; MEHRDADI, N. Influence of Petroleum Hydrocarbons on Plant Growth. **Phytoprotection**, v. 89, p. 21-29, 2008.

SICILIANO, S.; GERMIDA, J. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. **Environmental Reviews**, v. 6, p. 65-79, 1998.

SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J.; BANKS, K.; GREEN, C.W. (2003) Changes in microbial community composition and during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 483-489, 2003.

SINGH, R.; SINGH, P.; SHARMA, R. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 4, p. 1-6, 2014.

SLOAN, N.A. **Oil impacts on cold-water Marine Resources**: A review relevant to Parks Canada's evolving Marine Mandate. Occasional Paper 11, 1999.

SOLEIMANI, M.; AFYUNI, M.; HAJABBASI, M.A.; NOURBAKHS, F.; SABZALIAN, M.R.; CHRISTENSEN, J.H. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. **Chemosphere**, v. 81, p. 1084-1090, 2010.

SPEIGHT, J. G. **The Chemistry and Technology of Petroleum**. 953 f. 2014.

SPEIGHT, J.G.; ARJOON, K.K. **Biorremediation of Petroleum and Petroleum products**. 2012.

SPIRO, T.G.; STIGLIANI, W.M. **Química Ambiental**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009.

SUN, K.; LIU, J.; GAO, Y.; JIN, L.; GU, Y.; WANG, W. Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-10, 2014.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Jehse**, v. 2, p. 6-12, 2005.

TANASE, A.M.; IONESCU, R.; CHICIUDEAN, I.; VASSU, T.; STOICA, I. Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 84, p. 150-154, 2013.

TERRATHERM, A. Demonstration of In Situ Thermal Desorption Thermal Blankets and Wells. **TerraTherm Environmental Services, Inc.**, p. 01-04, 2003.

THAPA, B.; KC, A.K.; GHIMBRE, A. A review on Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, p. 164-170, 2012.

TIAN, Y.; LIU, H.J.; ZHENG, T.L.; KWON, K.K.; KIM, S.J.; YAN, C.L. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, p. 707-715, 2008.

TIBURTIUS, E.R.; PERALTA-ZAMORA, P.; EMMEL, A.; LEAL, E.S. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 28, p. 61-64, 2005.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 1025-1035, 2010.

TORRES, M.A.; VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, p. 306-312, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 920 p.

TRAN, V.T.; BENOIT, J.P.; VENIER-JULIENNE, M.C. Why and how to prepare biodegradable monodispersed polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, p 1-11, 2011.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M.M.R.; DE CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, p. 231-241, 2011.

UHMANN, A.; ASPRAY, T.J. Potential benefit of surfactants in a hydrocarbon contaminated soil washing process: Fluorescence spectroscopy based assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219-220, p. 141-147, 2012.

URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.L.; GABARDO, I.T.; PEREIRA JR, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 254-258, 1998.

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA, N.J.; MARINS, M.D.M. Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa. **Boletim Técnico da Petrobrás**, v. 41, p. 125-132, 1998.

USEPA - United State Environmental Protection Agency (1995) **How to Evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites**. Office of Solid Waste and Emergency Response. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.

USEPA - United State Environmental Protection Agency (2001). **Technology Innovation Office. Treatment technologies screening matrix and reference guide**. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.

USEPA - United State Environmental Protection Agency (2006) **Environmental Protection Agency. Office of Solid Waste and Emergency Response**. Office of Superfund Remediation and Tecnology Innovation. US Environmental Protection Agency. Washington, DC.

VAITSMAN, E.P.; VAITSMAN, D.S. **Química e Meio Ambiente: Ensino Contextualizado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 272 p.

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.

VARJANI, S.J.; RANA, D.P.; JAIN, A.K.; BATEJA, S.; UPASANI, V.N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, p. 116-124, 2015.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1163-1672, 2001.

VINCENT, A.O.; FELIZ, E.; WELTIME, M.O.; IZE-IYAMU, O.K.; DANIEL, E.E. Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 1, p. 8-14, 2011.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v. 132, p. 44-51, 2003.

WANG, Z.Y.; XU, Y. WANG, H.Y.; ZHAO, J. GAO, D.M.; LI, F.M.; XING, B. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. **Pedosphere**, v. 22, p. 717-725, 2012.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 115-129, 2005.

WANG, Z.; XU, Y.; ZHAO, J.; LI, F.; GAO, D.; XING, B. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 677-685, 2011.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 260-270, 2003.

WEBER, B.D.; SANTOS, A.A. Utilização de biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. **Educação Ambiental**, v. 10, p. 114-133, 2013.

WENZEL, W.W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. **Plant Soil**, v. 321, p. 385-408, 2009.

WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 78-87, 2011.

WHITE, P. M.; WOLF, D. C.; THOMA, G. J.; REYNOLDS, C. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 169, n. 1-4, p. 207-220, 2006.

WU, G.; COULON, F.; YANG, Y.; LI, H.; SUI, H. Combining solvent extraction and bioremediation for removing weathered petroleum from contaminated soil. **Pedosphere**, v. 23, p. 455-463, 2013.

WU, G.; LI, X.; COULON, F.; LI, H.; LIAN, J.; SUI, H. Recycling of solvent used in a solvent extraction of petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 533-539, 2011.

XIAO, C.; SUN, F. Fabrication of distilled water-soluble chitosan/alginate functional multilayer composite microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1366-1370, 2013.

XU, N.; BAO, M.; SUN, P.; LI, Y. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 22-30, 2013.

XU, S.Y.; CHEN, Y.X.; WO, W.X.; WANG, K.X.; LIN, Q.; LIAN, X.Q. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. **Science of the Total Environmental**, v. 363, p. 206-215, 2006.

YAP, C.L.; GAN, S.; NG, H.K. Application of vegetable oils in the treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 28-41, 2010.

ZAFRA, G.; ABSALÓN, A.E.; CUEVAS, M.D.; CORTÉS-ESPINOSA, D.V. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 225, p. 1826-1844, 2014.

ZHANG, J.; FAN, S.; YANG, J.; DU, X.; LI, F.; HOU, H. Petroleum contamination of soil and water, and their effects on vegetables by statistically analyzing entire data set. **Science of the Total Environmental**, v. 476-477, p. 258-265, 2014.

ZHANG, Y.; LIU, Z.L.; SONG, M.) ChiNet uncovers rewired transcription subnetworks in tolerant yeast for advanced biofuels conversion. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 4393-4407, 2015.

ZHONG, Y.; LUAN, T.; LIN, L.; LIU, H.; TAM, N.F.Y. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2965-2972, 2011.

ZHOU, H.W.; WONG, A.H.Y.; YU, R.M.K.; PARK, Y.S.; TAM, N.F.Y. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced structural shift of bacterial communities in mangrove sediment. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 153-160, 2009.



## ANEXO I

### INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

#### AIMS AND SCOPE

International Journal of Environmental Science and Technology (IJEST) is an international scholarly refereed research journal which aims to promote the theory and practice of environmental science and technology, innovation, engineering and management. A broad outline of the journal's scope includes; peer reviewed original research articles, case and technical reports, reviews and analyses papers, short communications and notes to the editor, in interdisciplinary information on the practice and status of research in environmental science and technology, both natural and man made. The main aspects of research areas include, but are not exclusive to; environmental chemistry and biology, environments pollution control and abatement technology, transport and fate of pollutants in the environment, concentrations and dispersion of wastes in air, water, and soil, point and non-point sources pollution, heavy metals and organic compounds in the environment, atmospheric pollutants and trace gases, solid and hazardous waste management; soil biodegradation and bioremediation of contaminated sites; environmental impact assessment, industrial ecology, ecological and human risk assessment; improved energy management and auditing efficiency and environmental standards and criteria. The journal accepts the following types of contributions:

- Original Paper
- Short Communication
- Review

**Manuscript Submission.** Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

**Permissions.** Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

**Online Submission.** Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

**Title Page.** The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

**Abstract.** Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

**Keywords.** Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

**Important remark**

-According to the journal policy, all first names should be abbreviated.

-All manuscripts shall have ONLY ONE corresponding author. Normally, the author who submits the manuscript is defined as the corresponding author in the system and, thereby, ONLY he/she shall be specified as the corresponding author in the title page.

**Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

**Headings.** Please use no more than three levels of displayed headings.

**Abbreviations.** Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

**Footnotes.** Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters. Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

**Acknowledgments.** Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

**The manuscript should be structured as follows:**

Introduction

Materials and methods

Results and discussion

Conclusion

Acknowledgements (they are obligatory)

**References**

**Citation.** Cite references in the text by name and year in parentheses.

**Reference list.** The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted.

**Tables.** All tables are to be numbered using Arabic numerals. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order. For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

**Please note:**

Graphs and Tables are limited to 10.

**Electronic Figure Submission.** Supply all figures electronically. Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

**Color Art.** Color art is free of charge for online publication. If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

**Figure Lettering.** To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt). Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label. Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

**Figure Numbering.** All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices should, however, be numbered separately.

**Figure Captions.** Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

**Figure Placement and Size.** Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width. For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

**Permissions.** If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

**Accessibility.** In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that. All figures have descriptive captions. Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information. Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

**Electronic Supplementary Material.** Springer accepts electronic multimedia files and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

**Submission.** Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

**Text and Presentations.** Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

**Spreadsheets.** Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

**Specialized Formats.** Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

**Collecting Multiple Files.** It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

**Numbering.** If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Name the files consecutively.

**Captions.** For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

**Processing of supplementary files.** Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

**Accessibility.** In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that. The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second.

**Scientific style.** Please always use internationally accepted signs and symbols for units. Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC. Genus and species names should be in italics. Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

## **AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

**Open Choice.** In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

**Copyright transfer.** Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

**Offprints.** Offprints can be ordered by the corresponding author.

**Color illustrations.** Publication of color illustrations is free of charge.

**Proof reading.** The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

**Online First.** The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

## **CONFLICT OF INTEREST**

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

## **ANEXO II**

### **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT**

#### **AIMS AND SCOPE**

The Journal of Environmental Management is a journal for the publication of peer reviewed, original research for all aspects of management and the managed use of the environment, both natural and man-made. Critical review articles are also welcome; submission of these is strongly encouraged. As governments and the general public become more keenly aware of the critical issues arising from man's use of his environment, this journal provides a forum for the discussion of environmental problems around the world and for the presentation of management

results. It is aimed not only at the environmental manager, but at anyone concerned with the sustainable use of environmental resources.

Research Areas Include, but are not exclusive to:

- resource quality, quantity and sustainability
- economics of environmental management
- transport and fate of pollutants in the environment
- spill prevention and management
- remediation of contaminated sites
- process modification for pollution prevention
- improved energy efficiency
- waste treatment and disposal

Papers submitted should address environmental management issues using a range of techniques e.g. case studies, observational and theoretical analyses, the application of science, engineering and technology to questions of environmental concern or mathematical and computer modeling techniques with the aim of informing both the researcher and practitioner.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

## **PREPARATION**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

**References.** There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage.

**Formatting requirements.** There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this

should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

**Figures and tables embedded in text.** Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### REVISED SUBMISSIONS

**Use of word processing software.** Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. See also the section on Electronic artwork.

### ARTICLE STRUCTURE

**Subdivision - numbered sections.** Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1, 1.2, etc. Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

**Introduction.** State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

**Material and methods.** Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

**Results.** Results should be clear and concise.

**Discussion.** This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

**Conclusions.** The main conclusions of the study must be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' may be indicated as a footnote to that

author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Abstract.** A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

**Graphical abstract.** Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

**Highlights.** Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

**Keywords.** Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Acknowledgements.** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

**Footnotes.** Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

#### **Artwork: General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- That individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

**Color artwork.** Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online regardless of whether or not these



illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only.

**Figure captions.** Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables.** Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

### **References:**

**Citation in text.** Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list. Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text.

**Reference links.** Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

**Web references.** As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known, should also be given. Web references can be listed separately under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

**Reference management software.** Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

**Reference formatting.** There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

**Text:** All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;

3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

**List:** References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

**Supplementary material.** Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved. Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s).

**Database linking.** Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

## SUBMISSION CHECKLIST

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources

Printed version of figures in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

**Use of the Digital Object Identifier.** The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

**Online proof correction.** Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and

answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Offprints.** The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop.

## ANEXO III

### FEMS MICROBIOLOGY LETTERS

#### AIMS AND SCOPE

FEMS Microbiology Letters gives priority to concise papers that merit urgent publication by virtue of their originality, general interest and their contribution to new developments in microbiology. All aspects of microbiology, except virology, are covered. Areas of special interest include: molecular biology and genetics; genomics; microbial biochemistry and physiology; structure and development; pathogenicity; medical and veterinary microbiology; environmental microbiology; applied microbiology and microbial biotechnology; systematics and bioinformatics. Papers (Research Letters and MiniReviews) can deal with any type of microorganism: bacteria, archaea, bacteriophage and archaeal viruses, yeasts, filamentous fungi, protozoa, cyanobacteria and eukaryotic algae. In addition, the journal will publish Perspective, Current Opinion and Controversy Articles, Commentaries and Letters to the Editor on topical issues in microbiology. The journal will consider succinct, one-page genome announcements of scientific interest. Statements that a sequence has been completed will not be considered without further justification for the announcement. The sequence must first be deposited in a freely available genome database.

#### EDITORIAL POLICY

All submitted research papers should be complete in themselves and adequately supported by experimental detail; they should not be preliminary versions of communications to be published elsewhere. Papers are expected to have findings that are novel, innovative, of significance and/or present new hypotheses; descriptions of new methods are acceptable. Papers that provide confirmatory evidence or merely extend observations firmly established in one species or field site to another will not be accepted unless there are strong reasons for doing so. Members of

the Editorial Board and other appropriate experts will referee the papers. Editors handling papers will independently make decisions on acceptance, revision, resubmission or rejection based on the referees' reports. The Chief Editor or Editors will reject papers, with an immediate decision, that are outside the scope of the journal, lack significance or which they believe do not meet the required standards for other reasons. Authors who feel that there are substantial grounds for disagreement with an Editor's decision should contact the Chief Editor, whose decision will be final. Authors who wish to withdraw their manuscript (at any stage of the process) should contact their Editor.

## **ARTICLE TYPES**

Research Letters describe original experimental work leading to significant advances within the scope of the journal. Repetition of information in the text and illustrations should not occur. Priority is given to short papers, the majority of which will occupy only four to six pages of the journal. The text (including abstract but excluding the title page, references in text and list, and figure legends) should not exceed 3000 words. References should be kept to a minimum and a combined total of six figures and tables are permitted. If the paper exceeds these guidelines, the manuscript will be returned for shortening without review unless the authors have provided compelling reasons for the exceptional length.

**MiniReviews** are concise articles reviewing topics of current interest or controversial aspects of subjects within the scope of the journal. Articles providing new concepts, critical appraisals and speculation are welcomed. The style for MiniReviews is the same as for research letters, except that the maximum length of the text is about 3,500, with a maximum combined total of six figures and tables. There is no rigid format for MiniReviews but they should generally include an Abstract and a brief Introduction in which the background to the article is presented. The remainder of the text should be arranged under a single, or a maximum two levels of subheading, finishing with a Conclusion or Outlook section that highlights the novelty of the MiniReview.

**Current Opinion**, Perspective and Commentary articles enable authors to present their views on important topical issues, to discuss new conceptual approaches and to consider, critically, future developments. Their format is flexible but follows that of MiniReviews, with similar maximum length. Please choose the manuscript type 'Other' when uploading through the online submission system.

**Letters to the Editor** are brief communications focusing on an article that has been published in the journal within the previous six months. They should focus on some aspect(s) of the paper that is, in the author's opinion, incorrectly stated or interpreted, controversial, misleading or in some other way worthy of comment. All Letters to the Editor must address a scientific issue in an objective fashion, should be fewer than 1000 words, and will be externally refereed. If acceptable for publication, they will be offered to the original authors for comment. Please choose the manuscript type 'Letter to the Editor' when uploading through the online submission system.

**Current Controversies in Microbiology** are short discussion articles that review the benefits and potential pitfalls of recently developed microbiological methods. Such articles will be in the form of a discussion section to a paper, with an informative introductory sentence to indicate

the core of the article, but will not include an Abstract, Introduction and other formal sections. A maximum of two published pages (typically about 1000 words) will be permitted. Please choose the manuscript type 'Other' when uploading through the online submission system.

**Genome announcements.** The journal also welcomes announcements of complete genome sequences, which must succinctly describe especially interesting features that are not already obvious from previously available datasets. The text (including abstract but excluding the title page, references in text and as a list, and figure legends) should typically not exceed 1000 words and should always include a relevant accession number linked to a free access public database. One figure or table would be acceptable, but the total length must not exceed two printed pages. References should be kept to a minimum. Authors who wish to exceed these guidelines should contact the Chief Editor.

**Nominated Reviewers.** When suggesting reviewers for manuscripts, members of the editorial board and/or suitably qualified scientists should be chosen who have no close affiliation with the authors and who can give an objective review of the manuscript. Professional e-mail addresses must be provided, if available, rather than private e-mail addresses. The Editors retain the right to use their discretion to select reviewers they deem appropriate, which may or may not include those nominated by authors.

Figures should be uploaded in separate files and at sufficient resolution (see section on Preparation of data). All obsolete files of the previous version should be deleted from the revised submission. If a paper that is returned to the authors for amendment is not resubmitted in revised form within one month, the paper will be regarded as withdrawn, unless request for extension is made to the Editor dealing with the paper. Any revised version received after this deadline will be treated as a new, resubmitted manuscript.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements.

## PREPARATION OF MANUSCRIPTS

**Language.** Manuscripts should be in English (consistent with either UK or US spelling). Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the language. You are strongly advised to ensure that the English is of a publishable standard prior to submission. Manuscripts that are seriously deficient in this respect will be rejected without peer review. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English.

**Layout of manuscripts.** FEMS politely requests you compile your manuscript in MS Word and save it as a .doc or .docx file (not a .pdf file), using the following layout. Title page, the abstract, main text in one single column and references. Tables, each on a separate page. Figure legends.

Figures, placing each figure on a separate page and ensuring that the figure is at least twice the size it will be in the published document. Include the figure number (e.g. Fig. 1) and optionally including the figure legend well outside the boundary of the space occupied by the figure. ScholarOne Manuscripts will combine your separately uploaded figure files and the manuscript

main body into one online file. Please ensure that you upload the figures only once, i.e. either embedded at the end of the text document or as separate files.

Tables, all tables must be cited in the text in the order that they appear. Explanatory footnotes should be related to the legend or table using superscript, lower-case letters. All abbreviations should be defined after the footnotes below the table. Tables should be supplied in Word or Excel format, and must be editable (not pasted in as a picture).

Use standard fonts (Arial, Times New Roman, Symbol, Helvetica, Times). In your Word document, on the Tools menu, click Options, select the Embed TrueType fonts check box and then click the Save tab. In assessing whether the manuscript falls within the recommended maximum length, one journal page is equivalent to approximately three manuscript pages, each table is approximately 0.3 of a printed page and each figure is approximately 0.25 of a printed page. The length of papers should be justified by the content and authors are urged to be concise. Excessively long reference lists should be avoided. Repetition of information in the text and illustrations should not occur.

**Title, authors, keywords and running title.** The manuscript should not form part of a numbered series but should be headed by a concise, informative title. Authors are reminded that titles are widely used in information-retrieval systems. The name, full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of one corresponding author should be provided in a footnote. FEMS journals only accept one corresponding author. Keywords should not include words in the title or abstract and authors should supply a running title of up to 60 characters (including spaces).

**General organisation of manuscripts.** Materials and Methods and Results are normally written in the past tense and the present tense is occasionally used in the Introduction and Discussion.

**Abstract.** This should be a single paragraph of less than 200 words and must be intelligible without reference to the full paper. Ideally, references are not cited. Abbreviations should be avoided, but if necessary, they must be defined the first time they are used in the main text. Do not abbreviate genus in the title, keywords, or at first use in the Abstract and Introduction. It is important that the abstract contains a clearly stated hypothesis, a concise description of the approach and a clear statement of the major novel findings of the study and their significance.

**Introduction.** This should place the work in the context of current knowledge, should indicate the novelty of the study and should conclude with a clear statement of the aims and objectives, but should not contain a summary of the results.

**Materials and Methods.** Sufficient detail must be provided to allow the work to be repeated. Suppliers of materials and a brief address should be mentioned if this might affect the results. Specific reference must be given for reagents (e.g. plasmids, strains, antibodies) that were not generated in the study.

**Results.** Presentation of data is described below.

**Discussion.** This should not simply repeat the Results. Combined Results and Discussion sections are encouraged when appropriate.

**Acknowledgements.** These can include funding agencies, colleagues who assisted with the work or the preparation of the manuscript and those who contributed materials or provided unpublished data.

**References.**