UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

CAROLINA DE AMORIM SOARES

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DA AMAZÔNIA

MANAUS

2020

CAROLINA DE AMORIM SOARES

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia

ORIENTADOR: Dr. EDMAR VAZ DE ANDRADE

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676d

Soares, Carolina de Amorim
Avaliação da degradação do óleo diesel por cepas bacterianas isoladas da Amazônia / Carolina de Amorim Soares . 2020
84 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edmar Vaz de Andrade
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cepas bacterianas. 2. Degradação do diesel. 3. biorremediação. 4. Xenobióticos. I. Andrade, Edmar Vaz de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CAROLINA DE AMORIM SOARES

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO DIESEL POR CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia

Aprovada em: 12/08/2020

BANCA EXAMINADORA

_____
Dr. Edmar Vaz de Andrade, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

_____
Drª. Cynthia Canêdo da Silva, Membro
Universidade Federal de Viçosa

_____
Dr. Adolfo José da Mota, Membro
Universidade Federal do Amazonas

_____
Drª. Elen Bethleen de Souza Carvalho, Suplente
Universidade Federal do Amazonas,

_____
Drª. Isabelle Bezerra Cordeiro, Suplente
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À Deus, por absolutamente tudo.

À minha mãe e meus primos, pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edmar Andrade, pela paciência, compreensão e sabedoria, que me ajudou a tornar este trabalho possível.

Aos meus amigos e amigas: Rayza, Agatha, Daniel, Antônio e Eloysa pela paciência, companheirismo e apoio durante minha jornada acadêmica

Aos meus companheiros de laboratório: Jefferson, Genilton, Júlio Nino e Isabelle pela colaboração e paciência.

Às instituições:

CAPES e CNPq, pelo fomento

UFAM, pela oportunidade de cursar o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela estrutura e equipamentos disponibilizados pelo Laboratório de Proteômica - LAPROT, sob coordenação do Prof. Dr. Edmar Andrade e, também pelo Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM (Divisão de Biotecnologia), sob coordenação da Dra. Sônia Carvalho.

RESUMO

O uso do petróleo e seus derivados possibilitou o avanço tecnológico em grande parte do mundo, beneficiando a economia, a indústria e a sociedade como um todo. Entretanto, todo esse impacto trouxe consequências diretas ao meio ambiente e à própria humanidade. A poluição causada pela combustão do petróleo, derramamentos acidentais de combustíveis nos ambientes aquáticos e terrestres e os efeitos causados em organismos vivos são alguns fatos que trazem à tona a problemática da degradação ambiental causada pelo uso desenfreado do petróleo e seus derivados. A busca incessante por soluções para este problema mostra que a biorremediação é uma alternativa viável e promissora, onde organismos vivos promovem a degradação dos compostos tóxicos do ambiente, e cada vez mais estudos nessa área tendem a explorar e elucidar o mecanismo que torna microrganismos capazes de serem aplicáveis à biorremediação. Neste trabalho, cepas de *Burkholderia arboris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.* e *Moraxella sp*. isoladas de consórcio foram avaliadas a fim de identificar características que possam promover a biorremediação do óleo diesel. As cepas *B. arboris* e *Burkholderia* sp. foram capazes de emulsificar hexano, xileno e diesel, enquanto *Moraxella* sp. que emulsificou apenas o xileno. Estas cepas tiveram a habilidade de se aderirem ao hexano e xileno, contudo apenas *Moraxella sp.* teve indícios de produção de biossurfactantes. Todas as cepas formaram biofilme e as cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. foram mais resistentes a antibióticos do que as cepas *B. cereus* e *Bacillus* sp. *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. apresentaram toxicidade durante a germinação de sementes de *Lactuca sativa*. Os resultados descritos neste trabalho são importantes para a proposição de um consórcio microbiano degrador de diesel.

Palavras chave: Cepas bacterianas. Degradação de diesel. Biorremediação. Xenobióticos.

ABSTRACT

The use of oil and its derivatives has enabled technological advances in much of the world, benefiting the economy, industry and society as well. However, all this impact caused direct consequences to the environment and to humanity itself. Pollution caused by oil, oil residues in aquatic and terrestrial environments and the deleterious effects on live animals are some negative factors on environment caused by the excess use of oil and its respective damages. The continuous search for solutions to this problem shows that bioremediation is a viable and promising alternative, where living organisms promote the degradation of toxic compounds in the environment, and many studies in this area have contributed to elucidate the mechanism related to bioremediation by microorganisms. In this work, strains of *Burkholderia arboris*, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. and *Moraxella* sp. isolated from consortium were tested to identify characteristics aduring bioremediation of diesel oil. The strains *B. arboris* and *Burkholderia* sp. were able to emulsify hexane, xylene and diesel, while *Moraxella* sp. emulsified only xylene. These strains also adhere to hexane and xylene, but only *Moraxella* sp. had evidence of biosurfactant production. All strains formed biofilm, and *B. arboris*, *Burkholderia* sp. and *Moraxella* sp. were more resistant to antibiotics than *B. cereus* and *Bacillus* sp. *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp. and *Moraxella* sp. presented toxicity for germination of *Lactuca sativa* seeds. Results described here contribute to knowledge for proposition of a diesel degrader consortium.

Keywords: Bacterial strains. Diesel degradation. Bioremediation. Xenobiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes. 27
Figura 2: Propriedades físico-químicas dos bioemulsificantes. Adaptado de UZOIGWE et al., 2015.....28
Figura 3: Fluxograma de atividades desenvolvidas no trabalho.....31
Figura 4: Área de estudo e locais (a e b) de coleta dos consórcios. Porto da Ceasa, bairro Educandos, Manaus (AM).....31
Figura 5: Lâmina de Gram da bactéria *Burkholderia arboris* (RN110) vista em microscópio óptico, aumento 100x.....33
Figura 6 Lâmina de Gram da bactéria *Bacillus cereus* (RN109) vista em microscópio óptico, aumento 100x: 34
Figura 7: Equação do índice de porcentagem de germinação residual normalizado (IGN) (a), e nível de toxicidade frente ao IGN (b).....39
Figura 8: Capacidade de formação de biofilme pelas cepas *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. e *Moraxella* sp. em placas de poliestireno.....45
Figura 9: Atividade emulsificante com as cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp.....48
Figura 10: Índices de hidrofobicidade celular (%) para hexano e xileno. 51
Figura 11: Produção de biossurfactantes de *B. arboris* (a), *Burkholderia* sp. (b) e *Moraxella* sp. (c).....54
Figura 12: Teste de fitotoxicidade utilizando *Lactuca sativa*. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição total de hidrocarbonetos do petróleo (HADIBARATA; TACHIBANA, 2009).....13
Tabela 2: Comparativo de custos de algumas das técnicas utilizadas para remediação de solos contaminados.....19
Tabela 3: Requisitos para biodegradação do petróleo 21
Tabela 4: Características morfológicas e identificação molecular das cepas isoladas. Resultados baseados em suas sequências 16S rRNA com base em consultas BLAST com o banco de dados do NCBI.....33
Tabela 5: Referencial para Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos de bactérias Gram positivas, da tabela 2B das Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS 35
Tabela 6: Referencial para Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos de bactérias Gram negativas, adaptado da tabela 2B das Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS 36
Tabela 7: Antibiograma das cepas Gram-positivas 41
Tabela 8: Antibiograma das cepas Gram-negativas.....42
Tabela 9: Índices do IGN das cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp e do controle BH + diesel em diferentes concentrações, e nível de toxicidade segundo os índices do IGN.....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11

2. REFERENCIAL TEÓRICO 13

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL 13

2.2 TÉCNICAS DE LIMPEZA DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO E DIESEL 16

2.3 BIORREMEDIAÇÃO 18

2.4 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA APLICAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO 20

2.5 BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E DERIVADOS 24

2.6 UTILIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES NA BIORREMEDIAÇÃO 26

3. OBJETIVOS 30

3.1 GERAL 30

3.2 ESPECÍFICOS 30

4. MATERIAL E MÉTODOS 31

4.1 DADOS ANTERIORES: COLETA, ISOLAMENTO, CULTIVO BACTERIANO E IDENTIFICAÇÃO 31

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS 34

4.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME 37

4.4 ATIVIDADE EMULSIFICANTE 38

4.6 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE 38

4.7 TESTE DE TOXICIDADE UTILIZANDO *Lactuca sativa* 39

5. RESULTADOS E DICUSSÃO 40

5.1 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS 40

5.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME 45

5.3 ATIVIDADE EMULSIFICANTE 47

5.4 HIDROFOBICIDADE CELULAR 50

5.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES 53

5.6 TESTE DE FITOTOXICIDADE UTILIZANDO *Lactuca sativa* 55

6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 59

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

1. INTRODUÇÃO

O avanço pós revolução industrial com a exploração e utilização do petróleo possibilitaram crescimento econômico em grande parte do mundo, inclusive no Brasil, criando uma cadeia produtiva do petróleo e seus derivados. Como consequência disso surgiram novos empreendimentos e produtos oriundos do petróleo. Grandes máquinas com motores movidos a combustão começaram a utilizar gasolina ou diesel como combustível, e isso gerou um impacto bastante positivo em muitos setores sociais (LIMA, 2012). Com o crescimento iminente da indústria petrolífera, cada vez mais o petróleo, seus constituintes, seus resíduos sólidos e líquidos são liberados no meio ambiente, oriundos de motores de máquinas ou de vazamentos acidentais, poluindo o ambiente terrestre e aquático (PALADINO, 2000; CRAIG et al., 2012).

O óleo diesel é derivado da destilação do petróleo, e é utilizado como combustível de meios de transporte como caminhões e embarcações. A região Norte possui grande fluxo de embarcações, e o vazamento de diesel nos rios ocorre por acidentes ou por armazenamento incorreto, levando à dispersão do mesmo e podendo trazer consequências drásticas ao meio ambiente aquático e para a população ribeirinha (MATOS, 2009).

A toxicidade do contaminante para um organismo é definida pela sua composição química, sua concentração no ambiente, o período de contato, as condições ambientais gerais e a condição fisiológica da biota (HATFIEL; STEWART, 1994; MEYER, 2011). Algumas propriedades físico-químicas desses compostos (petróleo, diesel, gasolina, etc.) contribuem para o agravamento desses problemas ambientais. Entre elas podemos citar: baixa solubilidade em água, alto coeficiente de adsorção e alta estabilidade do anel aromático (DEAN-ROSS et al., 2002; KANALY; HARAYAMA, 2002; VAN HAMME et al., 2003; KEBRIA et al., 2009), tornando-o tóxico para o ambiente e para os seres vivos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), também presentes em derivados de petróleo, constituem uma classe de poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico por apresentarem propriedades mutagênicas e carcinogênicas (BRITO et al., 2010). Diante disso, alternativas para despoluir ou pelo menos atenuar a degradação ambiental recorrente têm sido propostas, como por exemplo a biorremediação. Essa técnica vem sendo bastante estudada e tem como

princípio o uso de agentes biológicos (bactérias, fungos, plantas) capazes de modificar ou decompor poluentes alvos (MARIANO, 2006).

A literatura mostra que para que o processo de biorremediação seja eficaz, são necessárias mais de uma espécie bacteriana para degradar os poluentes no ambiente, pois uma espécie não consegue degradá-los por completo (ALEXANDER, 1994). A biodegradação do óleo diesel requer a ação de consórcios microbianos por ser uma mistura extremamente complexa considerando a composição química. De uma maneira geral, observa-se a ocorrência da co - metabolização em que existem microrganismos que se encarregam do ataque inicial aos constituintes da fonte oleosa, produzindo compostos intermediários que são, subsequentemente, assimilados por outras espécies microbianas (GHAZALI, 2004; SILVA, 2012). Desta forma, a elucidação da atividade de degradação do diesel por bactérias irá contribuir com o desenvolvimento de consórcios microbianos com potencial para biorremediação.

A criação de um sistema de biorremediação requer um extenso trabalho de conhecimento com os microrganismos de interesse. Então, além da identificação das espécies bacterianas, são realizados ensaios laboratoriais como forma de triagem desses organismos. Dentro da perspectiva da biorremediação, espera-se que as bactérias possuam características desejáveis para além da degradação do óleo diesel, então futuramente a biorremediação dos ambientes contaminados com diesel pode ser enfim realizada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO PETRÓLEO E ÓLEO DIESEL

O petróleo é um composto oleoso constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte por hidrocarbonetos, com pequenas quantidades de oxigênio, nitrogênio e enxofre, e possui alto conteúdo energético (BRITO et al., 2010; AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE,2001). Sua composição típica é: carbono (83 a 87 %), hidrogênio (11 a 14 %), enxofre (0,06 a 8,00 %), nitrogênio (0,11 a 1,70 %), oxigênio (0,5 %), metais (Fe, Zn, V, Cr, Pb) (0,30 %) (THOMAS, 2001; AGOSTINI JÚNIOR, 2016).

Os hidrocarbonetos constituintes do petróleo são subdivididos em dois grupos fundamentais: os alifáticos e os aromáticos. Os alifáticos podem ser lineares e ramificados. Os aromáticos, como sugere o nome, possuem anéis aromáticos, ou benzênicos em sua fórmula estrutural, dando, com isso, arranjo típico a esses hidrocarbonetos (YENDER et al., 2002).

Tabela 1: Composição total de hidrocarbonetos do petróleo (HADIBARATA; TACHIBANA, 2009)

Fração	**Porcentagem (%)**
Alcanos	52
Aromáticos	24
NSO*	16
Asfalteno	8

*Compostos Nitrogenados, Sulfurados e Oxigenados

As características físicas do petróleo variam bastante, podendo ser escuros, densos e viscosos, com pouco gás, ou tonalidades mais claras, com baixa densidade e viscosidade, com quantidade expressiva de gás (MARTINS, 2005). Apresentam ainda consistência oleosa e cheiro desagradável (MARTINS, 2005).

A partir do refino do petróleo bruto se pode obter:

- Gás de petróleo: gás residual com 1 a 2 átomos de carbono, usado para aquecimento e para a indústria;
- Gás liquefeito de petróleo (GLP): com 3 a 4 átomos de carbono, usado principalmente para cozinhar;
- Nafta: com 5 a 10 átomos de carbono, é um produto intermediário que irá se transformar em gasolina ou servirá de matéria-prima para a indústria petro-

química;

- Gasolina: com 5 a 8 carbonos, é utilizada como combustível para motores do ciclo Otto. É uma nafta que se transformou em gasolina por outros processos químicos;
- Querosene: com 11 a 12 carbonos, é usado principalmente como combustível para turbinas de jatos, além de outras aplicações;
- Óleo diesel: com 8 a 16 carbonos, é um combustível usado principalmente em transporte rodoviário e aquaviário, em motores do ciclo diesel, além de ser utilizado também em termoelétricas e para aquecimento
- Óleo lubrificante: com 26 a 38 carbonos, é usado principalmente na lubrificação de motores e engrenagens e como matéria-prima para graxas;
- Óleo combustível: até 39 carbonos, é utilizado principalmente como fonte de calor no segmento industrial;
- Resíduos: até 80 carbonos, servem como material inicial para a fabricação de outros produtos. Nesta faixa de compostos mais pesados estão: coque, asfalto, alcatrão, breu, ceras e outros.

O óleo diesel é amplamente utilizado em caminhões, embarcações e máquinas de grande potência de um modo geral. É constituído por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, entre outros. Dentre os hidrocarbonetos saturados presentes no óleo diesel os alcanos com 8 a 16 os átomos de carbono são os majoritários (PETROBRÁS, 2018). Contudo, aparecem ainda nessa mistura cicloalcanos alquilados, tais como os alquilciclohexanos, os decahidronaftalenos e os perhidrofenantrenos, além de compostos naftênicos, cujo teor depende diretamente da quantidade desse composto no óleo cru e das misturas estocadas, e ainda os fatores envolvidos no processamento do óleo diesel (SPEIGHT, 2006). O diesel é destilado em temperaturas que variam de 220 a 380 ºC (FERREIRA et al., 2008), ideal para motores de combustão interna por compressão.

Apesar de todo o contexto positivo acerca do uso do petróleo e derivados, a intensa exploração trouxe problemas perceptíveis com grande rapidez. A queima de diesel pode emitir partículas com conteúdo composto de material parcialmente queimado, matéria orgânica do combustível e do óleo lubrificante, carbono elementar, sulfatos,

mercaptanas, óxidos metálicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA, nitro-HPA), compostos reduzidos de enxofre, entre outros componentes, que também causam danos à saúde e polui o ar (CORRÊA; ARBILLA, 2008; GUARIEIRO et al., 2011).

Os derrames de petróleo e diesel causados acidentalmente estão entre as principais fontes de contaminação do solo e das águas subterrâneas e superficiais, além dos vazamentos em dutos e tanques de armazenamentos subterrâneos de combustível ou mesmo derramamentos diretos do óleo bruto, atividades de mineração e uso de defensivos agrícolas (ALABURDA; NISHIHARA, 1998). Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes se destacam frente aos demais. Neste caso, de forma geral, os compostos de interesse que exigem maior preocupação ambiental e que, normalmente, são os principais a serem identificados e quantificados antes e durante um processo de remediação são: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (isômeros: orto-, meta- e para-xileno), conhecidos também como BTEX, e são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos. São usados, principalmente, em solventes e em combustíveis e são os constituintes mais solúveis na fração da gasolina (ANDRADE et al., 2010).

No meio ambiente aquático, acidentes com derrames de petróleo e diesel se dão por armazenamento incorreto durante o transporte, falhas operacionais durante a extração ou refino do óleo bruto, entre outras causas. Do início da década de 1970 até o final de 2013, aproximadamente 10 mil acidentes envolvendo petróleo foram registrados pela Federação Internacional dos Proprietários de Navios Poluidores (ITOPF - *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited*), que ocasionaram derramamento de aproximadamente 5,74 milhões de toneladas de petróleo e derivados em ecossistemas marinhos (ITOPF, 2009). No Brasil, na bacia de Guanabara no ano de 2000 um duto da Petrobrás que ligava a Refinaria Duque de Caxias (Reduc) ao terminal Ilha d'Água, na Ilha do Governador, rompeu-se provocando um vazamento de 1,3 milhão de litros de óleo combustível nas águas da baía. A mancha se espalhou por 40 km² (ORTIZ, 2014). No Rio de Janeiro, em 03 de janeiro de 2018, um caminhão que saía de uma balsa atracada no mar derramou cerca de 100 litros de óleo diesel por conta de um furo no tanque durante a manobra de saída (BERTTI, 2018). Em 2019, um vazamento de petróleo atingiu a região litorânea de estados do Nordeste e Sudeste do Brasil, e foi considerado o maior derramamento

de óleo bruto do país, contando também com os impactos ambiental, social e econômico sofrido da região (PENA et al., 2020).

A região amazônica é cercada de grandes rios, portanto possui um grande fluxo de embarcações movidas a óleo diesel com risco de acidentes frequentes. Os riscos estão relacionados com possibilidade do combustível armazenado no tanque das máquinas, ou mesmo estocado para reabastecimento, ir parar nos rios, tributários e lagos. Considerando a extensão percorrida pelas embarcações, a quantidade de combustível transportado é da ordem de centenas a milhares de litros. Acidentes na região são pouco relatados, principalmente aqueles envolvendo embarcações de pequeno e médio porte (SANTOS, 2014). Em Manaus, no dia 05 de setembro de 2018, uma embarcação afundou e derramou óleo diesel nas imediações do porto do São Raimundo (ROSAS, 2018). Oito dias antes, também em Manaus, um rebocador do Porto Chibatão afundou e derramou cerca de 2 mil litros de óleo diesel no rio Negro (ROSAS, 2018).

2.2 TÉCNICAS DE LIMPEZA DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO E DIESEL

Quando ocorrem acidentes de derramamento de óleo, seja de petróleo, diesel ou outro derivado, medidas para controle dos mesmos são aplicadas. NEGRÃO (2007) aponta no Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas, que as medidas de remediação (‘aplicação de remédios’) podem ser divididas basicamente em dois tipos: medidas de contenção ou isolamento da contaminação e medidas para o tratamento dos meios contaminados, que visam à eliminação ou redução da contaminação em níveis aceitáveis ou previamente definidos. Ambas as medidas podem ser conjuntas durante a aplicação. Na maioria das vezes, soluções rápidas e baratas são facilmente postas a prática. Em geral, métodos físicos e químicos, como barreiras e contenção, aparelhos de sucção, uso de jatos d’água para dispersar o óleo, absorventes, formadores de gel, precipitantes e dispersantes químicos (CRAPEZ et al., 2002; BATISTA, 2009).

As barreiras de contenção servem para evitar o espalhamento do óleo em superfície aquática, direcionando o contaminante para uma área mais favorável ao seu recolhimento ou uma área menos vulnerável, e que também pode ser usada para preservar locais estratégicos contra a poluição (CRAIG et al., 2012). O uso de equipamentos que removem as manchas de óleo (*skimmers*, barcaças recolhedoras,

caminhões a vácuo, absorventes granulados) é aliado das barreiras (CRAIG et al., 2012). Segundo ERNESTO (2010), os elementos que constituem as barreiras de contenção são: flutuador de material flutuante, elemento de tensão longitudinal (garante estabilidade à barreira), saia (diminui a fuga do óleo por baixo da barreira) e borda livre (reduz a fuga do óleo por cima da barreira) (ERNESTO, 2010). Existe também a técnica de jateamento com água, onde um jato de água pressurizado é lançado na superfície terrestre ou aquática, e pode ser associado a dispersantes (LOPES, 2007; MIRANDA et al., 2014). Essa técnica, porém, pode interferir no equilíbrio do ecossistema aquático ou terrestre, pois a ação mecânica causa impactos principalmente em regiões entremarés (LOPES, 2007).

Os dispersantes químicos são substâncias que aceleram a dispersão das manchas de óleo para sejam removidas da superfície. Estes produtos contêm surfactantes e solventes que reagem com as moléculas do óleo fazendo-o mais solúvel em água. Segundo CRAIG e colaboradores, a aplicação desses dispersantes requer o conhecimento do tipo de óleo, condições do tempo, dimensão, localização da mancha de óleo e transportes para a aplicação dos mesmos (CRAIG et al., 2012). Os absorventes também são utilizados em acidentes com petróleo e derivados, por conta da sua afinidade. Existem na forma granulada, ou envolvidos em tecidos porosos formando “salsichões” ou “almofadas” (SZEWCZYK, 2006). Possuem baixa eficácia em óleos mais pesados, de baixa viscosidade e flutuantes (MIRANDA et al., 2014). Além do uso dos dispersantes, a técnica de oxidação química *in-situ* promove a oxidação dos contaminantes de interesse no local desejado. Dependendo do contexto, a oxidação pode ser um pré-tratamento para que demais técnicas sejam posteriormente aplicadas (ANDRADE et al., 2010). Os reagentes mais utilizados são: reagente de reagente de Fenton (H_2O_2 /Fe^{2+}/H^+), persulfato ($S_2O_8^{2-}$), permanganato (MnO_4^-), ozônio (O_3/UV; O_3/H_2O_2/UV; O_3/$^-$OH; O_3/H_2O_2), H_2O_2/UV e fotocatálise heterogênea (TiO_2/UV) (ANDRADE et al., 2010). Segundo ANDRADE e colaboradores (2010), o peróxido de hidrogênio em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é mais empregado na remediação, enquanto em águas subterrâneas (e solos também) o reagente de Fenton é bastante utilizado (ANDRADE, 2005; ANDRADE et al., 2010).

No caso de acidentes de derramamento de óleo no solo e águas subterrâneas, existem técnicas de remediação como o bombeamento e tratamento (“*pump and*

treat”), que bombeia as águas subterrâneas contaminadas fisicamente e o tratamento é feito acima do solo (NOBRE; NOBRE, 2008). São necessárias bombas elétricas ou pneumáticas para captar a água impactada (SANTOS et al., 2008). O “*air sparging*” é uma injeção de oxigênio no aquífero contaminado que volatiliza os contaminantes com o borbulhamento da água contaminada e é utilizado em conjunto com um sistema de extração de vapores, que arrasta os contaminantes para fora com um fluxo de ar (ROCHE, 2008; TECHNOHIDRO, 2008; SANTOS et al., 2008). A extração de vapores do solo utiliza um vácuo que induz o fluxo de ar remover os contaminantes voláteis e semivolateis, e os gases passam por uma estação de tratamento de vapores (TECHNOHIDRO, 2008). A lavagem do solo é uma técnica que utiliza produtos químicos inseridos por cavidades no subsolo contaminado e que irá extrair íons metálicos através da sua solubilização com esses produtos químicos (ácidos ou básicos), além de ajustar o pH do solo e ser auxiliada pelo *pump and treat* (TAVARES, 2013).

Dentre as técnicas térmicas, existe a queima *in situ*, que é aplicada para retirar o óleo com a queima em substratos combustíveis (madeira, por exemplo) (HAYES, et al., 1992). CRAIG e colaboradores apontam que esta técnica possui limitações, como por exemplo as fontes de ignição, a própria segurança de quem a aplica, e a liberação de resíduos no ambiente após a queima, que em ambientes aquáticos pode afundar (CRAIG et al., 2012), portanto deve-se ter atenção antes e após optar por esta técnica. Já a dessorção térmica é uma técnica que utiliza um jato de água quente (ou vapor quente) dentro do solo para que os contaminantes sejam volatilizados, transportados para um condensador e removidos por bombeamento (TAVARES, 2013). É aplicada de acordo com a natureza do contaminante, ou seja, compostos orgânicos voláteis e semivolateis, principalmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Possui limitantes, como a espessura do solo em relação ao contaminante, e causa impacto na fauna, flora e microbiota por conta do calor (TAVARES, 2013).

2.3 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma técnica de descontaminação de ambientes contaminados que se utiliza de organismos vivos, plantas ou microrganismos (bactérias e fungos), com a finalidade de atenuação ou neutralização de determinados contaminantes presentes no meio ambiente. Todavia, para que haja eficiência nesse processo, alguns fatores tornam-se condicionantes como, temperatura, presença de

oxigênio, nutrientes e pH (BERGER, 2005; MUTECA, 2012; MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016). O conhecimento do processo de limpeza de petróleo por microrganismos vem aumentando ao longo do avanço técnico-científico, onde as técnicas de biorremediação se mostram bastante efetivas para a limpeza de ambientes contaminados por hidrocarbonetos, devido a simplicidade da manutenção e baixo custo de execução (BUENO, 2008; LIMA et al., 2015).

Tabela 2: Comparativo de custos de algumas das técnicas utilizadas para remediação de solos contaminados

Tratamento	Custo Estimado de Remediação (U$)/ Tonelada
Remoção para Aterros	Acima de 100
Processos Físicos	
Lavagem de solo	25-150
Lavagem Físico-química	50-175
Extração a vapor	75
Processos Químicos	
Extração por Solvente	50-600
Desalogenação Química	175-450
Correções Superficiais	10-25
Tratamentos Térmicos	
Dessorção térmica	25-225
Incineração	50-1200
Tratamentos Biológicos	
Landfarming	10-90
Bioventilação	15-75
Biorreator de Lama	50-85
Biopilhas	15-35
Biorremediação *in-situ*	175

Fonte: Adaptado de MALLMANN et al., 2019

Cada processo de biorremediação é particular e quase sempre necessita de adequação e otimização específica para a aplicação em diferentes locais afetados, requerendo sempre uma análise integrada de parâmetros físicos, químicos e biológicos (BUENO, 2008; LIMA et al., 2015). Os fatores que poderão influenciar na biodegradação, serão fatores físicos e químicos no qual vão depender da composição da matriz do ambiente (pH, salinidade, potencial oxirredução, etc.), fatores extrínsecos (temperatura, umidade) e fatores relacionados ao poluente (estrutura química, presença de outros compostos, biodisponibilidade) (MELO; AZEVEDO, 2007; LIMA et al., 2015).

Existiram casos aos quais a técnica de biorremediação foi aplicada e após um ano se obteve a eficácia de 90 % de redução da contaminação existente, enquanto nas regiões em que não se obteve o seu uso, tiveram apenas 15 % dessa redução

(PRINCE, 1993; COSTA FILHO, 2011; MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016). Estes dados ressaltam a grande contribuição de sistemas biológicos na despoluição de áreas impactadas.

Os processos relacionados à biorremediação podem ser classificados de acordo com o tratamento e a fase empregada. De acordo com o local de tratamento, os processos de biorremediação são denominados *in situ* (quando é realizado no próprio local) ou *ex situ* (quando há remoção do contaminante para tratamento em outro ambiente). Para cada processo deve se levar em conta qual o tipo e quantidade de poluente, os custos para implementá-lo, sobretudo, a concentração final ao término do tratamento, pois é a partir desses fatores, que se possibilitará o uso futuro dessa área (MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016).

A biorremediação *in situ* no tratamento do solo no local da contaminação consiste na utilização de processos que vão da inserção de oxigênio e nutrientes até a adição de organismos específicos para cada tipo de contaminante. Desta forma não se faz o uso da remoção do material contaminado, evitando custos e distúrbios ambientais do solo. Os produtos finais de uma biorremediação eficaz são a água (H_2O) e o dióxido carbônico (CO_2), que não apresentam toxidade ao meio ambiente (MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016).

O processo de biorremediação *ex situ* em solos contaminados é composto por vários processos: *land farming*, bioestímulo, bioaumento e biorreatores. Esses processos fazem uso de unidades móveis e estações fixas de tratamento para promoverem a descontaminação do ambiente (MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016).

2.4 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA APLICAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO

A princípio, requer-se uma biorremedição que seja adequada tanto à proteção da saúde humana quanto à do meio ambiente de um modo geral, levando-se em conta: as incertezas no que se refere à disposição do poluente no terreno; persistência, toxidez, mobilidade e tendência à bioacumulação das substâncias; riscos à saúde humana a curto e longo prazo; custos de manutenção em longo prazo; possibilidade de custos futuros de limpeza se a remedição não funcionar (VIDALLI, 2001; LIMA et al., 2015). GAYLARDE et al. (2005) pontua que cada processo de biorremediação é particular e quase sempre necessita de adequação e de uma otimização específica para aplicação em diferentes sítios afetados, além de análise de parâmetros físicos, químicos e biológicos

Em termos de biorremediação de petróleo e óleo diesel usando microrganismos, é necessário que eles sejam capazes de metabolizar esses compostos. Felizmente existem bactérias descritas na literatura com esta capacidade (BOOPATHY, 2000; WIDDEL; RABUS, 2001; VAN HAMME et al., 2003; DÍAZ, 2004; FERGUSON et al., 2007; JACQUES et al., 2007; MANDRI; LIN, 2007; TONINI et al., 2010). Na tabela 3 são mostradas algumas características importantes para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo por microrganismos.

Tabela 3: Requisitos para biodegradação do petróleo

Microrganismos com 1. Enzimas oxigenases 2. Habilidade para aderir aos hidrocarbonetos 3. Potencial de emulsificação
Elementos químicos necessários 1. Água 2. Oxigênio 3. Fósforo 4. Nitrogênio

Fonte: ROSENBERG; RON *apud* CRAWFORD; CRAWFORD (1996). Adaptado de BATISTA (2009)

Fatores como temperatura podem influenciar na atividade metabólica e consequentemente na taxa de degradação dos compostos xenobióticos. LEAHY e COLWELL (1990) mostraram que a variação de temperatura influencia na taxa de degradação de HPA's, pois as bactérias respondem a mudanças na temperatura aumentando ou diminuindo seu metabolismo, e isso pode limitar ou não a incorporação e degradação desses compostos. Outros fatores como pH, potencial redox, salinidade e umidade do ambiente também exercem influência na atividade biodegradadora, além das características pertinentes ao poluente em questão.

O fator patogenicidade de microrganismos deve ser levado em consideração, pois em ambientes aquáticos eles podem ser encontrados com frequência (ALONSO et al, 2001; BAQUERO et al, 2008). Além dos fatores genéticos responsáveis pela transmissão dos genes de resistência a antibióticos, o despejo de poluentes, resíduos industriais, agentes antimicrobianos entre outros, podem contribuir para a evolução e disseminação desses microrganismos no meio ambiente (ALONSO et al, 2001; BAQUERO et al, 2008). A cepa *Pseudomonas aeruginosa* que é conhecida pela produção de ramnolipídios, que é um biossurfactante capaz de facilitar a degradação compostos hidrofóbicos, seria capaz de participar do processo de biorremediação de

áreas contaminadas por petróleo e derivados. Porém, por ser um patógeno oportunista, a utilização desse biossurfactante em inúmeros processos requer tecnologias adequadas e medidas especiais que são tomadas a fim de evitar infecções (MARCHANT; BANAT, 2012). Técnicas como o teste de sensibilidade a antimicrobianos permitem a detecção de cepas resistentes e sensíveis a antimicrobianos/antibióticos (NCCLS, 2003), visando a biossegurança durante a manipulação dos microrganismos e sendo importante para além das análises *in vitro*.

O biofilme consiste em uma aglomeração de células bacterianas que secretam substâncias extracelulares poliméricas (EPS), que formam a estrutura do biofilme e ajudam na adesão celular a superfícies e na coesão do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). As EPS são responsáveis por manter as células imóveis no biofilme, e isso permite a interação entre elas. Elas também permitem a reciclagem de nutrientes, inclusive de fragmentos de DNA de células mortas, serve como proteção contra patógenos, desidratação, substâncias nocivas, da radiação ultravioleta, e protege contra a ação de agentes antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001 *apud* FLEMMING; WINGENDER, 2010).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA em sua resolução nº 463, de 29 de julho de 2014, restringe os remediadores que podem causar desequilíbrio ambiental. E ainda, segundo a instrução normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA nº 5, de 17 de maio de 2010, em seu art. 23, parágrafo único, declara que não se conceda registro de produto remediador contendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* e quaisquer outros produtos que possam causar ou oferecer riscos ao meio ambiente e aos seres vivos (NORMAS BRASIL, 2010). É possível perceber que a investigação do potencial patogênico de cepas bacterianas degradadoras de diesel seja realizada para que seja determinada a continuidade ou não do uso de determinada cepa para futuras pesquisas na biorremediação.

Além dos fatores mencionados anteriormente, a possibilidade de que compostos oriundos do metabolismo bacteriano degradador de hidrocarbonetos possam conferir toxicidade ao meio ambiente e a organismos vivos também é um fator a ser considerado, principalmente pensando na futura aplicação desses microrganismos na biorremediação. Os testes de toxicidade são importantes para

determinar as concentrações nas quais um determinado produto químico pode ser tóxico e se provoca efeitos deletérios em uma dada população de organismos, de acordo com o organismo-teste (BERTON, 2013). Bactérias, algas, peixes e microcrustáceos são utilizados para testar o efeito da toxicidade de algum composto químico no ambiente aquático. Para medir efeitos agudos, são utilizados organismos como *Artemia salina* (microcrustáceo), *Vibrio fischeri* (bactéria), *Danio rerio* (peixe) (COSTA et al., 2008), seguindo as normas ABNT e CETESB. As sementes de alface (*Lactuca sativa*) também podem ser testadas para medir o efeito da toxicidade da água contaminada com algum composto químico (MONTAGNOLLI et al., 2015), de acordo com a sua taxa de germinação frente a sua exposição a águas residuais. Testar a toxicidade do sobrenadante da cultura onde microrganismos degradam óleo diesel é possível e recomendável, pois se espera que a (s) cepa (s) cause menos ou nenhum dano ao meio ambiente, e com isso triar as cepas que possam estar degradando o contaminante sem liberar resíduos tóxicos no meio ambiente, causando o mínimo ou nenhum impacto ao ambiente já poluído.

Uma única espécie microbiana não consegue degradar todos os compostos presentes no petróleo e seus derivados. A biodegradação do óleo requer a ação de consórcios microbianos (várias espécies) por ser extremamente complexa do ponto de vista bioquímico. De uma maneira geral, existe a ocorrência da metabolização colaborativa em que existem microrganismos que se encarregam do ataque inicial aos constituintes da fonte oleosa, produzindo compostos intermediários que são, subsequentemente, assimilados por outras espécies microbianas (GHAZALI, 2004; SILVA 2012). Ensaios utilizando consórcios microbianos isolados tanto de rio como do solo são realizados para testar a futura utilização deles na recuperação de áreas degradadas por petróleo, diesel e afins. Desta forma, o processo em larga escala pode ser otimizado, prevendo uma garantia de que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA’s) e outros hidrocarbonetos serão metabolizados. O trabalho de MUKHERJEE e BORDOLOI (2011) mostrou que um consórcio bacteriano contendo cepas de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de biorremediar amostras de solo contaminadas por petróleo por 180 dias em laboratório, possibilitando até mesmo a germinação de plantas nas amostras. Já o trabalho de WANG e colaboradores (2020) trabalharam na biorremediação *in situ* de uma área do mar Bohai, na China, poluída.

por petróleo. Foram selecionadas bactérias autóctones capazes de degradar o óleo, inoculadas nas áreas de interesse e monitoradas por 210 dias. Como resultados, as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e *n*-alcanos foi reduzida significativamente (eficiência de 68,01 % e 60,99 %, respectivamente), além da diminuição dos metais pesados ao longo do monitoramento.

O estudo com culturas bacterianas puras oriundas de consórcios pode estabelecer relações com o perfil de degradação dos hidrocarbonetos, devido à possibilidade da ocorrência de interações interespecíficas que interferem no metabolismo ou mesmo no crescimento de determinada (s) espécie (s).

2.5 BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO E DERIVADOS

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo têm sido isoladas. Diversos foram os gêneros identificados, como por exemplo os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (CRAPEZ et al., 2002; JACQUES et al., 2007; MANDRI; LIN, 2007; SEO et al., 2009), *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*, *Nocardia, Rhodococcus*, *Mycobacterium* e *Alcaligenes* já foram descritos na literatura como microrganismos degradadores de xenobióticos (COLLA, 2012).

Quanto ao gênero *Bacillus*, relatos também indicam o envolvimento de várias espécies desse gênero na degradação dos compostos de petróleo. As mais citadas são *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. oleovorans* e *B. subtilis* (MARGESIN; SCHINNER, 2001). *B. cereus*, por exemplo, é reconhecidamente capaz de metabolizar pireno, um dos derivados do petróleo (KAZUNGA; AITKEN, 2000). A biorremediação de hidrocarbonetos clorados, tais como clorobenzoato e pentaclorofenol, pode ser feita por *B. subtilis* (KAZUNGA; AITKEN, 2000)

Estudos com bactérias do gênero *Burkholderia*, especialmente com a cepa *Burkholderia cepacia*, demonstraram que ela possui potencial degradador de hidrocarbonetos, incluindo n-alcanos (MOHANTY; MUKHERJI, 2008), compostos aromáticos (GRIFOLL et al., 1995; REVATHY et al., 2015), pesticidas e herbicidas (BHAT et al, 1994), benzo (a) pireno e outros compostos de anéis fundidos (JUHASZ et al., 1997) e também a biodegradação do petróleo bruto (VELRAEDS et al., 1996). Uma cepa de *B. vietnamiensis* foi descrita como degradadora de tricloroetileno testado em aquíferos contaminados e a cepa *B. xenovorans* descrita como degradadora de bifenilos policlorados (BPC) (DUA et al., 2002; FURLAN, 2011).

Espécies do gênero *Moraxella* já foram descritas com potencial degradador de

de diesel isoladamente (RAHMAN et al., 2003), mas principalmente unidas a consórcios (RAHMAN et al., 2002; SHARMA; REHMAN et al., 2009; BHASHEER et al., 2014). RAHMAN e colaboradores também testaram a capacidade de uma cepa de *Moraxella sp*. degradadora de óleo diesel e demais óleos. Os resultados mostram que a mesma possui capacidade de emulsificar xileno, benzeno, o próprio diesel e outros combustíveis, além de produzir biossurfactantes e reduzir a tensão superficial dos solventes testados.

Na região amazônica, existem trabalhos de prospecção de bactérias degradadoras de petróleo e óleo diesel, as quais foram caracterizadas por diferentes metodologias. BATISTA (2009) isolou bactérias associadas à planta macrófita *Eichornia crassipes* na região de Manaus, como cepas dos gêneros *Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Methylobacterium*, *Pantoea* sp., *Enterobacter*. Grande parte das cepas foram capazes de degradar petróleo bruto e diferentes hidrocarbonetos, além de produzirem biossurfactantes e bioemulsificantes. ARAÚJO (2014) também isolou e identificou cepas bacterianas capazes de degradar petróleo oriundas de outras plantas macrófitas do rio Negro, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter junii*, *Bacillus pumilis* e *Lysinibacillus fusiformes*, e tais cepas foram capazes de degradar petróleo e óleo diesel. LOPES (2019) isolou a cepa *Burkholderia gladioli* Coa14 do lago de Coari (Amazonas) e verificou seu potencial de degradação de petróleo, além de caracterizar sua morfologia, montar seu genoma, realizar ensaios de biodegradação e resistência a antibióticos, obtendo resultados satisfatórios dentro da perspectiva de aplicar futuramente a biorremediação.

O grupo de pesquisa Proteômica e Bioprospecção na Amazônia, localizado no Laboratorio de Proteomica na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus, realiza trabalhos relacionados à biorremediação em diversos aspectos. SANTOS (2014) identificou proteínas via espectrometria de massas relacionadas à degradação de petróleo e óleo diesel de *Bacillus pumilus* isolado de macrófitas aquáticas nas proximidades de uma refinaria. As 54 proteinas identificadas tiveram uma provável relação com vias metabólicas de degradação de hidrocarbonetos. CARDENES (2017) e SOUZA-NETO (2019) trabalharam com a cepa *Acinetobacter junii* SB132 explorando sua capacidade de degradação do óleo diesel. Foram identificadas proteínas relacionadas à degradação de hidrocarbonetos, especialmente alcanos, e a quantificação da degradação de alcanos do diesel obtida

foi entre 60 % e 87 % (CARDENES, 2017). Essa cepa também possui a capacidade de formar biofilme, grande sensibilidade a antimicrobianos, capaz de aderir e emulsificar o diesel e diferentes hidrocarbonetos, não produziu biossurfactantes, e foram encontrados genes relacionados à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de acordo com os dados adquiridos do sequenciamento de parte do genoma (SOUZA-NETO, 2019). As pesquisas feitas com a bactéria *A. junii* SB132 relevam que ela pode vir a ser utilizada para a biorremediação de ambientes contaminados por óleo diesel e afins futuramente.

2.6 UTILIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES NA BIORREMEDIAÇÃO

Os microrganismos de interesse para biorremediação são submetidos a testes que visam demonstrar o potencial biodegradador de determinada cepa ou cepas, além de identificar características pertinentes que podem viabilizar o desenvolvimento da técnica de biorremediação. A produção microbiológica de moléculas capazes de degradar compostos tóxicos tem sido investigada com o intuito de caracterizar seus aspectos físicos, químicos e biológicos das mesmas (FERHAT et al., 2011; SHAVANDI et al., 2011; ZHENG et al., 2012; LUNA et al., 2013, ŁAWNICZAK et al, 2013). Essas moléculas, de maneira geral são anfifílicas, formam micelas e diminuem a tensão superficial em contato com superfícies hidrofóbicas. Elas são divididas em dois grupos (NEU, 1996; BANAT et al, 2010): os compostos de baixo peso molecular ou biossurfactantes, e os compostos de alto peso molecular ou bioemulsificantes (SMYTH et al, 2010).

Além do baixo peso molecular, os biossurfactantes são compostos por carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e ácidos carboxílicos como grupo funcional presente (UZOIGWE et al., 2015), além de se dissolverem em solventes polares e apolares (pois são anfifílicos) (PERFUMO et al., 2009; SATPUTE et al., 2010; SMYTH et al., 2010; UZOIGWE et al., 2015). Essas moléculas possuem capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, formam emulsões e possuem baixa concentração micelar crítica (CMC) (UZOIGWE et al., 2015). Os principais grupos de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LANG, 2002; FARIA, 2010). A figura 1 mostra alguns biossurfactantes bastante conhecidos, suas propriedades físico-quimicas e fisiológicas e também o microrganismo produtor. De

acordo com a figura 1, esses biossurfactantes possuem propriedades que vão além de diminuir a tensão superficial, e que podem ter aplicações em diversas áreas, assim como na biorremediação.

Figura 1: Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes.

Biossurfactante	Classe	Origem microbiana	Propriedades fisico-químicas	Papeis fisiológicos	Referências
Glicolipídios	Ramnolipídios	*Pseudomonas aeruginosa* DS10-129	Um ou dois açúcares ramnose ligados ao ácido 3-hidroxidecanóico. ST-28 mN / m EI24- 53–73 %	Biorremediação	RAHMAN et al., 2002
	Soforolipídios	*Candida bombicola* *Candida tropicalis*	Soforoses dissacarídicas (2-O-b-D-glucopiranosil-D-glucopiranose) ligado a ácidos graxos. ST-32.1–34.2 mN / m	Detergente aditivo para melhor desempenho e remoção de manchas; Limpeza de superfície; Atividade antibacteriana	DEVELTER; LAURYSSEN, 2010; JOSHI-NAVARE et al., 2013
	Trealolipídios	*Rhodococcus wratislaviensis BN38* *Norcardia farcinica BN26*	Dissacarídeo não redutor com duas unidades de glicose ligadas em uma ligação a,a 1,1-glicosídica; ST-24.4 mN/m EI- 23-70%	Biorremediação de locais poluídos; Atividade antitumoral	TULEVA et al., 2008; CHRISTOVA et al., 2014
Lipopeptídios	Surfactina	*Bacillus subtilis K1* *Bacillus siamensis*	Depipeptídeos heptacíclicos consistindo de dois aminoácidos ácidos, quatro aminoácidos hidrofóbicos e ácidos graxos C13-17 b-hidroxi ST- 22–27.9 mN/m	Recuperação de óleo aprimorada; Antibacteriano; Antiviral Antimycoplasma Antitumoral Anticoagulante Inibição da enzima	ONGENA;JACQUES, 2007; VARADAVENKATESAN; RAMACHANDRA, 2013; PATHAK; KEHARIA, 2014
	Iturina	*Bacillus subtilis K1* *Bacillus amylofaciens*	Cicloheptapeptídeo com sete aminoácidos e ácidos graxos C13-16 b-amino	Antifungico; Biopesticida	ARREBOLA et al., 2010; PATHAK; KEHARIA, 2014
	Fengicina	*Bacillus subtilis*	Deca-depsipeptídeos cíclicos com C14-21 b-hidroxi ácido graxo e 10 aminoácidos	Forte agente fungitóxico contra fungos filamentosos; Atividades de imunomodulação	ARREBOLA et al., 2010; PATHAK ; KEHARIA, 2014

Fonte: Adaptado de UZOIGWE et al., 2015

Os biossurfactantes vêm sendo estudados com afinco por possuírem características desejáveis em diversas áreas como na recuperação avançada de petróleo, remoção de contaminação por metais pesados, biorremediação, alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, biomedicina e nanotecnologia (EUSTON, 2017; SARUBBO et al., 2016; JAHAN et al., 2019). Essas moléculas são biodegradáveis e possuem baixa toxicidade, possibilitando a substituição dos surfactantes sintéticos por estas biomoléculas.

Diferente do que se lê, os biossurfactantes não equivalem aos bioemulsificantes. Os bioemeulsificantes possuem maior peso molecular, e são formados por polímeros como heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas (PERFUMO et al. 2009; SMYTH et al., 2010; SEKHON-RANDHAWA, 2014; UZOIGWE et al., 2015).

Os bioemulsificantes mais conhecidos estão na figura 2. De acordo com a figura, as características comuns a todos os bioemulsificantes é a emulsificação de substâncias hidrofóbicas, semelhante aos biossurfactantes. Porém, os bioemulsificantes não possuem a capacidade de reduzir tensão superficial como os biossurfactantes.

Figura 2: Propriedades físico-químicas dos bioemulsificantes

Bioemulsificante	Origem microbiana	Propriedades físico-químicas	Papeis fisiológicos	Referências
Emulsan RAG-1	*Acinetobacter* sp. ATCC 31012 (RAG-1)	Lipopolissacarídeos. Porção lipídica (ácido graxo insaturado de C10-18) Fração de polissacarídeo (D-galactosamina, Ácido D-galactosaminurônico, di-amino-6-desoxi-D-glicose)	-Aumentar a área de superfície e biodisponibilidade de substratos pouco solúveis -Ligação a metais pesados tóxicos	CHOI et al., 1996; RON and ROSENBERG, 2001
Emulsan BD4	*Acinetobacter calcoaceticus* BD4 13	Complexo de proteína-polissacarídeo. Porção de polissacarídeos (repetindo heptassacarídeos de L-ramnose, ácido D-glucourônico, D-manose)	- Estabiliza emulsões de óleo em água	KAPLAN and ROSEBERG, 1985; KAPLAN et al., 1987
Alasan	*Acinetobacter radioresistens* KA53	Polissacarídeos e proteínas contendo alanina	- Atividade de emulsificação e solubilização	NAVON-VENEZIA et al., 1995; WALZER et al., 2006
Manoproteínas	*Saccharomyces cerevisiae Kluyveromyces marxianus*	Polissacarídeos e proteínas	- Formação de emulsão estável com substratos hidrofóbicos - Estimulação do sistema imunológico	CASANOVA et al.,1992; LUKONDEH et al.,2003
Bioemulsificadores de ácido urônico	*Halomonas eurihalina Klebsiella* sp.	Polissacarídeos, proteínas, ácidos urônicos	- Emulsificação e desintoxicação de hidrocarbonetos	MARTÍNEZ-CHECA et al., 2002; JAIN et al., 2013

Fonte: UZOIGWE et al., 2015 (adaptado)

No que diz respeito a questões ambientais, os biossurfactantes podem contribuir na biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados. Por possuírem baixa concentração micelar crítica (CMC), capacidade de emulsificação e de reduzir tensão superficial /interfacial, podem ser aplicados para descontaminação de ambientes poluídos por compostos xenobioticos. Em ambientes terrestres ou aquáticos onde existe contaminação por hidrocarbonetos, por exemplo, a presença de microrganismos produtores de biossurfactantes possibilita a degradação desses compostos, pois influenciam na hidrofobicidade da célula bacteriana, permitindo a melhor captação deles pelas bactérias (JAHAN et al., 2019). Eles podem também aumentar a biodisponibilidade do substrato e fazendo com que a bactéria incorpore e utilize esse substrato hidrofóbico em seu metabolismo (CHEN, 2004; ZHONG et al., 2016; JAHAN et al., 2019). Os produtos da degradação desses hidrocarbonetos (gás carbônico, água e minerais) são liberados no meio ambiente (LIMA et al., 2011). Da mesma forma, os bioemulsificantes podem ser uteis e aplicáveis a diversas áreas, incluindo a biorremediação. Essas moléculas, similarmente aos biossurfactantes, podem solubilizar compostos imiscíveis no ambiente, e isso os torna mais acessíveis aos microrganismos que utilizarão essas moléculas em seu metabolismo. Elas também estabilizam emulsões, o que os torna interessantes em processos que envolvem biorremediação de compostos xenobióticos, como o petróleo, óleo diesel e derivados (CALVO et al.,2009; MONTEIRO et al., 2010; UZOIGWE et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar as características de cepas bacterianas degradadoras de óleo diesel isoladas de um consórcio microbiano.

3.2 ESPECÍFICOS

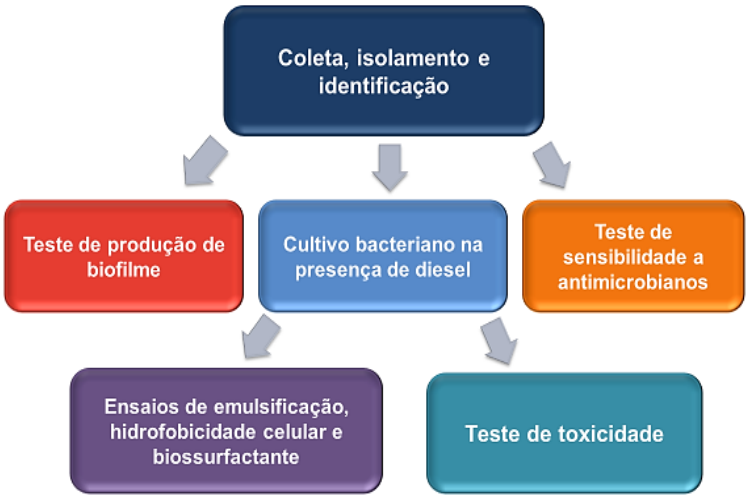
- Avaliar a resistência a antibióticos e a capacidade de produzir biofilme;

- Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes, níveis de hidrofobicidade celular e atividade emulsificante;

- Avaliar a toxicidade do meio após degradação do diesel em sementes de *Lactuca sativa*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3: Fluxograma de atividades desenvolvidas no trabalho

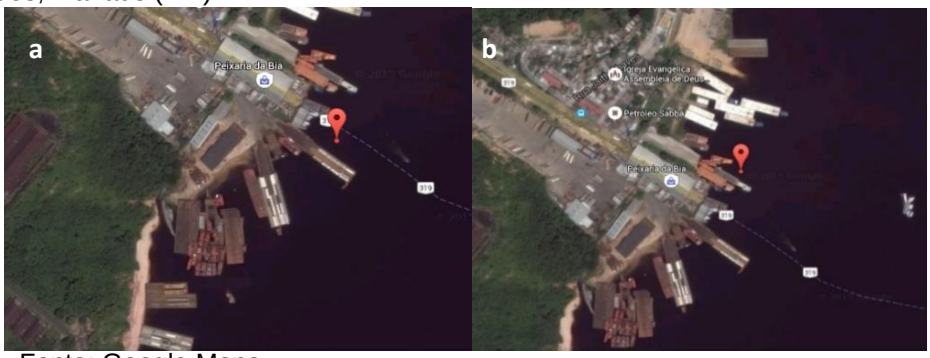


4.1 DADOS ANTERIORES: COLETA, ISOLAMENTO, CULTIVO BACTERIANO E IDENTIFICAÇÃO

- Coleta

As coletas foram realizadas pela Dra. Isabelle Bezerra Cordeiro (dados não publicados) em 09/10/2015 nas proximidades do porto do Ceasa (Rio Negro), na cidade de Manaus, em dois pontos conforme indicados pelas coordenadas S 03º08´09.0 e W 59º56´18.0 (a), S 03º08´05.6 e W 059º56´17.6 (b) (Figura 4). No ponto “a”, foi coletada água contendo óleo, e em “b” a coleta incluía parte do solo contaminado com óleo, ambas em Erlenmeyers estéreis e em triplicata. Em laboratório, as amostras foram reunidas em novo frasco estéril, e 1 mL foi inoculado em 100 mL meio Büshnell-Haas (BH) líquido, acrescido de 1 % de diesel e incubado a 30 ºC, 150 rpm. O crescimento foi monitorado por 1 semana.

Figura 4: Área de estudo e locais (a e b) de coleta dos consórcios. Porto da Ceasa, bairro Educandos, Manaus (AM).



Fonte: Google Maps

- Cultivo e isolamento bacteriano

A partir da cultura feita das amostras coletadas, uma alíquota foi inoculada em meio BH e ágar 0,75 % acrescido de óleo diesel (meio *soft*) em tubos de criopreservação para estocar as células. Posteriormente, os consórcios foram cultivados, primeiramente como pré-inóculo, em 5 mL de meio BH e diesel (1 %), a 30 ºC, 150 rpm. Após 24 h de crescimento, a leitura da absorbância a 600 nm por meio do espectrofotômetro BioMate3 (Thermo) foi feita, e em seguida utilizando placas contendo meio Luria Bertani (LB) foram adicionadas alíquotas diluídas das culturas (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-9}). As placas foram incubadas a 30 ºC durante 3 dias. Em seguida, as colônias isoladas das placas na diluição 10^{-4} de cada consórcio foram preservadas em tubos de criopreservação contendo meio *soft*.

Os cultivos das bactérias isoladas realizados para os ensaios deste trabalho foram feitos utilizando meio BH (100 mL), acrescido de diesel 1 %, contidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL. As culturas foram incubadas a 30 ºC, sob agitação de 150 rpm por 5 dias.

- Identificação morfológica e molecular das cepas isoladas

Esta etapa foi realizada pelo MSc. Jefferson Ferreira dos Santos (dados não publicados). As bactérias foram caracterizadas morfologicamente pela técnica de Gram. A identificação molecular foi feita por sequenciamento automatizado do gene 16S do RNA ribossomal e com acesso ao banco de dados do GenBank. As sequências nucleotídicas foram editadas no Chromas Lite 2.01 e submetidas à pesquisa BLAST. As sequências obtidas do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos foram depositadas no GenBank. Posteriormente, o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN foi realizado, para assegurar o uso legal e regular desses microrganismos para fins científicos pelo grupo de pesquisa Proteômica e Bioprospecção na Amazônia (UFAM), cujo código é ADC2DF7.

De acordo com a tabela 6, dos 15 isolados foram identificadas 6 cepas bacterianas, 3 delas em nível de espécie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Burkholderia arboris*) e 2 em nível de gênero (*Bacillus* sp. e *Moraxella* sp.). Devido a Instrução Normativa do IBAMA nº 5 de 17/05/2010 no artigo 23, parágrafo único, que o desenvolvimento de produtos biorremediadores, foi decidido retirar esta cepa do

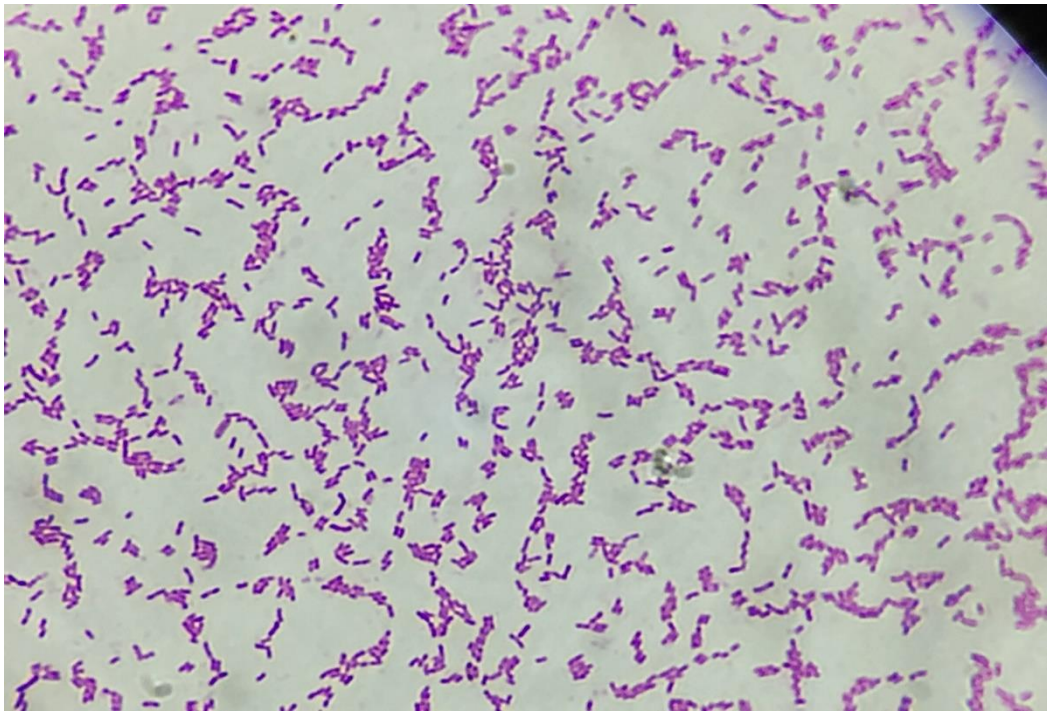
trabalho. Os isolados RN109, RN110, RN205, RN222 e RN249 foram utilizados nos demais testes. As figuras 5 e 6 mostram as lâminas de Gram feitas de dois isolados.

Tabela 4: Características morfológicas e identificação molecular das cepas isoladas. Resultados baseados em suas sequências 16S rRNA com base em consultas BLAST com o banco de dados do NCBI

Amostras	**Espécie**	**Gram**	**Forma e arranjo**	**Identidade**	**Cobertura (bases)**	**Código de Acesso**
RN109	*Bacillus cereus*	+	Bacilo, individual	100%	470	KX581729.1
RN205 RN220	*Bacillus sp.*	+	Bacilo, individual	100%	468	-
RN110 RN123	*Burkholderia arboris*	--	Bacilo, individual	100%	458	KX082851.1
RN222	*Burkholderia sp.*	-	Bacilo, individual	100%	446	-
RN202 RN249	*Moraxella sp.*	-	Cocobacilo, diplococo	100%	447	-
RN115 RN122 RN130 RN138 RN207 RN230 RN251	*Pseudomonas aeruginosa*	--	Bacilo, individual	100%	467	KY769876.1

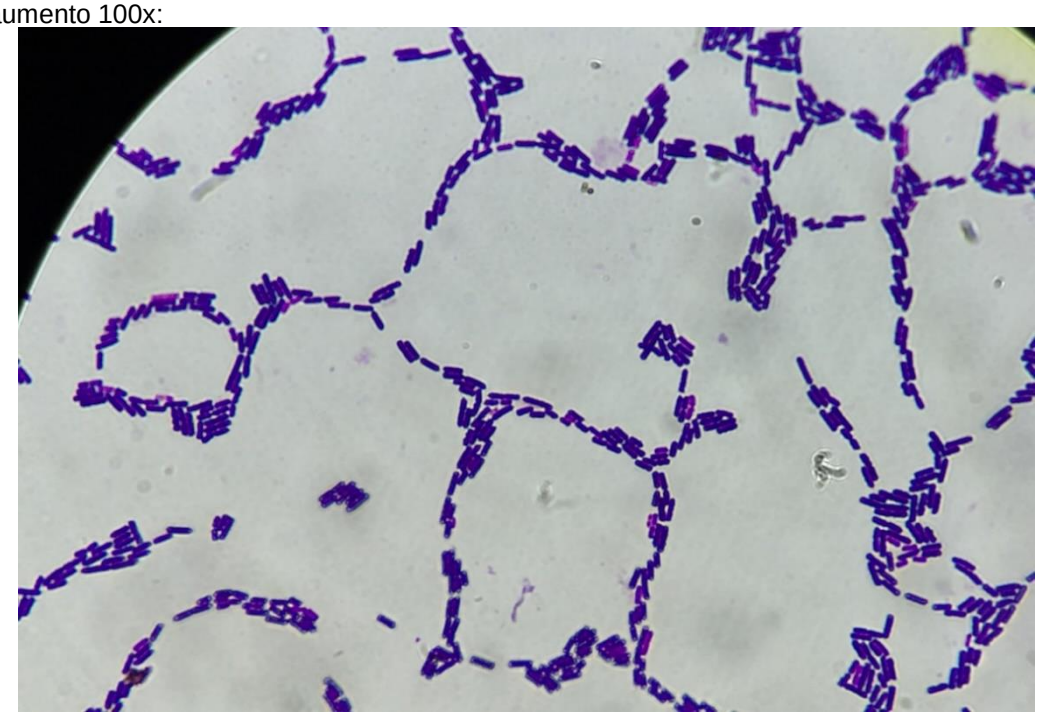
Fonte: Jefferson Ferreira dos Santos, adaptado. Dados não publicados

Figura 5: Lâmina de Gram da bactéria *Burkholderia arboris* (RN110) vista em microscópio óptico, aumento 100x



Fonte: Jefferson Ferreira dos Santos. Imagem não publicada

Figura 6 Lâmina de Gram da bactéria *Bacillus cereus* (RN109) vista em microscópio óptico, aumento 100x:



Fonte: Jefferson Ferreira dos Santos. Imagem não publicada

4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade das espécies dos consórcios a antibióticos foi realizado segundo as Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (NCCLS) (NCCLS, 2005), adequando-se algumas condições aos microrganismos-teste. As cepas foram cultivadas por no máximo 24 h em meio LB caldo. Posteriormente mediu-se a densidade celular em espectrofotômetro a 600 nm e ajustou-se o volume da suspensão para 0,1 de absorbância (equivalente a 0,5 McFarland) em solução salina 0,85 % estéril. Mergulhou-se um *swab* estéril nesta suspensão de células por alguns instantes e o excesso foi retirado pressionando na parede do tubo. Em seguida, em uma placa (140 mm de diâmetro) contendo meio Müeller-Hinton sólido (70 mL), o *swab* foi inserido sob movimento deslizante por três vezes, girando a placa 60° a cada movimento. A placa foi deixada em repouso por 3 min a fim de absorver o excesso de umidade. Em seguida, com auxílio de uma pinça, foi colocada uma unidade de multidiscos (Laborclin) de antibióticos sobre o meio de cultura, pressionando-o suavemente para assegurar contato completo. A placa foi incubada a 30 °C por 18 a 24 h. Os halos foram medidos utilizando uma régua e considerou-se halo de inibição a área sem crescimento detectável a olho nu. Os diâmetros dos halos foram interpreta-

dos como resistentes, resistência intermediária e sensíveis de acordo com as tabelas 5 e 6. Os experimentos foram realizados com três cultivos independentes e três réplicas experimentais para cada cepa cultivada.

Tabela 5: Referencial para Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos de bactérias Gram positivas, da tabela 2B das Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS

		Halos de inibição em mm		
Antimicrobiano	**Potência (µg)/ Código**	**Resistente**	**Intermediário**	**Sensível**
Ampicilina Para *Enterococcus* spp Para *Streptococcus* spp (Só Beta) Para *Haemophilus spp*	AMP 10	≤ 16 - ≤ 18	- - 19 – 21	≥17 ≥ 24 ≥ 22
Azitromicina Para *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* Para *Haemophilus* spp	AZI 15	≤ 13 -	14 - 17 -	≥ 18 ≥ 12
Ciprofloxacina Para *Staphylococcus* spp Para *Haemophilus* spp	CIP 05	≤ 15 -	16 – 20 -	≥ 21 ≥ 21
Oxacilina Para *Staphylococcus aureus* Para *Staphylococcus* coag. Neg.	OXA 01	-	-	-
Gentamicina Para *Staphylococcus* spp	GEN 10	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Linezolida Para *Staphylococcus* spp Para *Enterococcus* spp Para *Streptococcus*	LNZ 30	≤ 20 ≤ 20 -	- 21 – 22 -	≥ 21 ≥ 23 ≥ 21
Sulfazotrim para *Staphylococcus* spp e *Haemophilus* spp	SUT 25	≤ 10	11 – 15	≥ 16
Tetraciclina Para *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp Para *Streptococcus pneumoniae* Para *Streptococcus* spp Para *Haemophilus* spp	TET 30	≤ 14 ≤ 24 ≤ 18 ≤ 25	15 – 18 25 - 27 19- 22 26 – 28	≥ 19 ≥ 28 ≥ 23 ≥ 29

Penicilina G Para *Staphylococcus* spp Para *Streptococcus pneumoniae* (1 ug Oxacilina) Para *Streptococcus* β hemolítico Para *Enterococcus* spp	PEN 10	≤ 28 - - ≤ 14	- - - -	≥ 29 ≥ 20 ≥ 24 ≥ 15
Rifampicina para *Enterococcus* spp e *Staphylococcus* spp Para *Streptococcus pneumoniae*	RIF 05	≤ 16 ≤ 16	17 - 29 17 -18	≥ 20 ≥ 19
Vancomicina Para *Enterococcus* spp Para *Staphylococcus* spp Para *Streptococcus* spp	VAN 30	≤ 14 - -	15 – 16 - -	≥ 17 - ≥ 17
Eritromicina Para *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp Para *Streptococcus* spp	ERI 15	≤ 13 ≤ 15	12 -22 16 – 20	≥ 23 ≥ 21
Cefoxitina para *Staphylococcus aureus* Cefoxitina para *Staphylococcus* coag. Neg.	CFO 30	≤ 20 ≤ 24	-	≥ 22 ≥ 25
Cloranfenicol Para *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp Para *Streptococcus pneumoniae* Para *Streptococcus* spp Para *Haemophilus* spp	CLO 30	≤ 12 ≤ 20 ≤ 17 ≤ 25	13 – 17 - 18 - 20 26 – 28	≥ 18 ≥ 21 ≥ 21 ≥ 29

Fonte: Manual para Antibiograma (Laborclin, 2011)

Tabela 6: Referencial para Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos de bactérias Gram negativas, adaptado da tabela 2B das Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do NCCLS

Antimicrobiano	**Potência/ Código**	**Resistente**	**Intermediário**	**Sensível**
Amicacina	AMI 30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina/ ácido clavulânico	AMC 30	≤ 13	14-17	≥ 18
Ampicilina	AMP 10	≤ 13	14-16	≥ 17
Aztreonam	ATM 30	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefazolina parenteral para *Enterobacteriaceae* Cefazolina oral para *Enterobacterriaceae*	CFZ 30	≤ 19 ≤ 14	20-22 –	≥ 23 ≥ 15

Cefepime	CPM 30	≤ 18	–	≥ 25
Cefoxitina	CFO 30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftazidima	CAZ 30	≤ 17	18-20	≥ 21
Ceftriaxona	CRO 30	≤ 19	20-22	≥ 23
Ciprofloxacina Para *Enterobacteriaceae* Para *Salmonella* spp. Extra-intestinal (incluindo *S. typhi* e *S. paratyphi* a-c)	CIP 05	≤ 15 ≤ 20	16-20 21-30	≥ 21 ≥ 31
Cloranfenicol	CLO 30	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicina	GEN 10	≤ 12	13-14	≥ 15
Meropenem para *Enterobacteriaceae* Para *Pseudomonas aeruginosa* Para *Acinetobacter spp.* Para *Burkholderia cepacia*	MPM 10	≤ 19 ≤ 15 ≤ 14 ≤ 15	20-22 16-18 15-17 16-19	≥ 23 ≥ 19 ≥ 18 ≥ 20
Sulfazotrim	SUT 25	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	TET 30	≤ 11	12-14	≥ 15

Fonte: Manual para Antibiograma (Laborclin, 2011)

4.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME

A capacidade de formação de biofilme das espécies bacterianas foi avaliada em microplacas de poliestireno (adaptado de POIMENIDOU et al., 2016). As cepas foram inoculadas em 5 mL de caldo LB e cultivadas a 30 ºC sob agitação de 150 rpm por 24 h. As células foram diluídas com caldo LB estéril para 0,1 a 600 nm (0,5 na escala McFarland) foram transferidos para placas de microtitulação de 96 poços e incubadas a 30 ºC por 24 h. A densidade óptica foi obtida a partir do 595 nm utilizando o Leitor de Microplacas Chameleon (Hidex). Os poços foram lavados duas vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente durante 1 h. As células aderidas foram fixadas a 80 °C durante 10 min e coradas com 150 µL de solução de violeta de cristal (1 %) durante 20 min em temperatura ambiente. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e 200 µL de solução de etanol-acetona (80:20) foram adicionados em cada poço. As microplacas foram armazenadas a 4 °C por 15 min e 100 µL da

solução foram transferidos para uma nova microplaca para obtenção do valor de absorbância em 570 nm. Foi utilizado caldo LB isento de células como controle negativo e a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 80958 como formadora de biofilme padrão (controle positivo). Três culturas independentes e três réplicas técnicas por cultura para as estirpes e controles foram utilizadas. As médias do valor do biofilme foram analisadas pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) e pelo método de Tukey usando o *software* Minitab versão 2018 e os dados foram expressos pelo próprio programa.

4.4 ATIVIDADE EMULSIFICANTE

Após o cultivo das cepas por 5 dias em BH/diesel (cultivo nas condições já descritas), o volume total das culturas (100 mL) foi centrifugado por 30 min a 4 ºC, 4.000 rpm. Foram utilizados 4 mL de sobrenadante, que foram adicionados a um tubo de vidro de rosca (15 x 150 mm). Após isso, foram adicionados 4 mL de solvente orgânico (hexano, xileno e diesel, ambos a 100 %). A mistura foi agitada vigorosamente por 5 min e deixada em repouso. As medidas da altura da fase oleosa, aquosa e emulsificada foram verificadas em 24, 48 e 72 h para obtenção dos índices de emulsificação. O índice de emulsificação foi calculado usando a fórmula: E (%) = He/Ht x 100, (He - altura da fase emulsificada; Ht - altura total). Como controles da atividade emulsificante foram utilizados: meio de cultura BH estéril (controle negativo), Triton X-100 e Tween 20 (controles positivos), estes dois últimos a 0,5 %. O teste foi realizado utilizando três culturas independentes de cada cepa com três réplicas experimentais de cada cultura, e as médias dos índices de aderência celular foram analisadas pela Análise de Variância Unidirecional (ANOVA) e pelo método de Tukey usando o *software* Minitab versão 2018 e os dados foram expressos pelo próprio programa.

4.6 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Tubos contendo 1 mL das culturas bacterianas cultivadas por 5 dias em BH/diesel como descrito foram deixados em *overnight* a 4 °C. Depois disso foram centrifugados por 3 min a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi separado das células e do óleo gelado com auxílio de uma pipeta. O sobrenadante foi filtrado usando filtro de 0,22 µm (Millipore). Foram retirados 135 µL de sobrenadante filtrado e aplicados sobre uma superfície hidrofóbica (parafilme) para verificar a retenção da gota. Foram usados como controle: água destilada, SDS 0,1 % e 1 % (modificado de

JAIN et al., 1991). O teste foi realizado utilizando três culturas independentes de cada cepa com três réplicas experimentais de cada cultura.

4.7 TESTE DE TOXICIDADE UTILIZANDO *Lactuca sativa*

A fitotoxicidade de hidrocarbonetos residuais e/ou os subprodutos de degradação microbiana presentes nas amostras das cepas isoladas foram avaliadas em ensaio estático envolvendo a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) (adaptado de MONTAGNOLLI et al., 2015). As sementes foram compradas de fornecedores locais, do mesmo lote e livres de qualquer tratamento químico prévio. As cepas bacterianas isoladas foram cultivadas por 5 dias em BH/diesel nas mesmas condições descritas anteriormente. A toxicidade do meio BH com diesel também foi testada (meio BH estéril + diesel 1 %), que foi utilizado como controle positivo para toxicidade. O ensaio foi realizado em placas de Petri esterilizadas (10 cm) contendo papel filtro. Foram adicionados 4,0 mL de sobrenadante de cultura para embeber o papel filtro. Este sobrenadante foi testado nas concentrações: 100 %, 50 % e 25 %, onde estas concentrações foram obtidas diluindo-se o sobrenadante de cultura em meio BH estéril. As sementes foram então adicionadas às placas de Petri sobre o papel embebido, num total de 10 sementes para cada placa. Como controle negativo para toxicidade foi utilizada água destilada. Após 7 dias de incubação sob iluminação constante a 27 ºC, a germinação das sementes foi avaliada e o índice de germinação foi calculado por meio da fórmula: Índice de Germinação (%) = (Número de sementes germinadas no extrato / Número de sementes germinadas no controle) x 100 (ROCHA; et al., 2015). Foi calculado também o índice percentual de germinação residual normalizado (IGN) utilizando a fórmula descrita na figura 7 para indicar o nível de toxicidade (GONZÁLEZ et al., 2011). O teste foi feito utilizando três culturas independentes de cada cepa com três réplicas experimentais de cada cultura.

Figura 7: Equação do índice de porcentagem de germinação residual normalizado (IGN) (a), e nível de toxicidade frente ao IGN (b)

a

$$IGN\ (\%) = \frac{Germ\ x - Germ\ controle}{Germ\ controle}$$

Onde: *Germ x* é a porcentagem média de sementes germinadas em cada amostra; *Germ controle* é a porcentagem de sementes germinadas no controle.

b

Nível de toxicidade	IGN (%)
Baixa	0 a -0,25
Moderada	-0,25 a -0,5
Alta	-0,5 a -0,75
Muito alta	-0,75 a -1,0
Hormese	>0

Fonte: MELO (2018) *apud* GONZÁLEZ et al. (2011)

5. RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

- Gram-positivas

De acordo com a tabela 7, dentre o total de 15 antimicrobianos testados, *Bacillus* sp. apresentou sensibilidade a nove antibióticos (ampicilina, ciprofloxacina, cefoxitina, linezolida, penicilina, rifampicina, sulfazotrim, tetraciclina e vancomicina) resistência a quatro (azitromicina, clindamicina, cloranfenicol e eritromicina), e susceptibilidade intermediara a um (gentamicina). *B. cereus* foi resistente a sete antimicrobianos (ampicilina, azitromicina, clindamicina, cefoxitina, penicilina, rifampicina e sulfazotrim), intermediária a quatro (ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina) e sensível a três (gentamicina, linezolida e vancomicina).

A espécie *Bacillus cereus* é encontrada em diversos ambientes, e pode se tornar um patógeno oportunista causando intoxicação alimentar em humanos (BOTTONE, 2010; EHLING-SCHULZ et al., 2019). Apesar disso, costuma ser sensível à maioria dos antibióticos (TURNBULL et al., 1979; SONG et al., 2019). *B. cereus* foi utilizado em 1966 para isolar a primeira enzima metalo β-lactamase (MβL), que é codificada cromossomicamente (SABATH; ABRAHAM, 1966; KUWABARA; ABRAHAM, 1967; HUSSAIN et al., 1985; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008). Essa enzimas são caracterizadas por: hidrolisar todos os β-lactâmicos disponíveis comercialmente, com exceção do aztreonam; necessitarem de íons zinco ou outros cátions divalentes como cofator para a sua atividade catalítica; não ser inibidas pelos β-lactamases disponíveis comercialmente, mas podem ser inibidas por agentes quelantes como EDTA e derivados de tiol (BUSH, 1995, 1998, 2001; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

Estudos feitos por SONG e colaboradores, uma cepa de *B. cereus* isolada do solo contaminado com resíduos nucleares na China se mostrou resistente a doze antibióticos, incluindo lincomicina, tetraciclina, fosfomicina, aminoglicosídeo, linezolida, cloranfenicol, rifampicina, macrólitos, daunorubicina, mupirocina, cefalosporinas e carbapenem (SONG et al., 2019). Além disso, os pesquisadores detectaram 496 genes de virulência no genoma sequenciado, os quais são associados a produção de citotoxinas, adesão celular, proteínas enzimas de degradação e genes

de resistência a antibióticos (SONG et al., 2019), corroborando com os resultados do teste de susceptibilidade a antibióticos realizado.

Tabela 7: Antibiograma das cepas Gram-positivas

Antibiótico	*B. cereus*	*Bacillus sp.*
AMP 10	R	S
AZI 15	R	R
CIP 05	I	S
CLI 02	R	R
CLO 30	I	R
ERI 15	I	R
GEN 10	S	I
OXA 01	SI	SI
CFO 30	R	S
LNZ 30	S	S
PEN 10	R	S
RIF 05	R	S
SUT 25	R	S
TET 30	I	S
VAN 30	S	S

Legenda: Ampicilina 10 µg (AMP 10), Azitromicina 15 µg (AZI 15, Ciprofloxacina 5 µg (CIP 05), Clindamicina 2 µg (CLI 02), Cloranfenicol 30 µg (CLO 30), Eritromicina 15 µg (ERI 15), Gentamicina 10 µg (GEN 10), Oxacilina 1 µg (OXA 01), Cefoxitina 30 µg (CFO 30), Linezolida 30 µg (LNZ 30), Penicilina G 10 µg (PEN 10), Rifampicina 5 µg (RIF 05), Sulfazotrim 25 µg (SUT25), Tetraciclina 30 µg (TET 30), Vancomicina 30 µg (VAN 30). I: Intermediário, R: Resistente, S: Sensível, SI: Sem Informação. Fonte: Manual para Antibiograma (Laborclin, 2011).

Outras espécies dentro do gênero *Bacillus* resistentes a antibióticos já foram descritas em amostras ambientais e em ambientes como hospitais (GUÉROUT-FLEURY et al., 1995; CHIKERE et al., 2008; FERREIRA et al., 2017; ZHOU[1] et al., 2018; ZHOU[2] et al., 2018). As cepas de *Bacillus* utilizadas neste trabalho apresentaram um perfil de sensibilidade diferente, onde *Bacillus* sp. foi a cepa que apresentou maior susceptibilidade à grande parte dos antibióticos, ao contrário de *B. cereus*.

- Gram-negativas

Os resultados do teste das cepas *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. constam na tabela 8. Estas cepas apresentaram resistência à maioria dos antimicrobianos testados. *B arboris* foi resistente à doze antibióticos (amicacina,amoxilina/ ácido clavulânico, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime,

ceftriaxona, gentamicina, sulfazotrim e tetraciclina) dos quinze antimicrobianos, apresentou padrão intermediário a três destes (ciprofloxacina, cloranfenicol e meropenem), e sensibilidade a apenas a ceftazidima. A cepa *Burkholderia* sp. foi resistente a doze antimicrobianos (amicacina, amoxilina/ácido clavulânico, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, ceftriaxona, gentamicina, meropenem e tetraciclina) e intermediária a 3 (ciprofloxacina, cloranfenicol, sulfazotrim).

O gênero *Burkholderia* é um gênero de bactérias Gram-negativas pertencentes a família *Burkholderiaceae* e que pertence ao complexo *Burkholderia cepacia* (COENYE; VANDAMME, 2003; MORAES, 2014). Esse grupo de bactérias geralmente apresenta resistência a antibióticos, como por exemplo: ampicilina, piperacilina, ticarcilina, amoxilina+clavulanato, amoxilina+sulbactam, aztreonam (ARRUDA, 2017). Grande parte das espécies desse gênero está associada a infecções hospitalares, pois essas bactérias possuem uma grande adaptabilidade a esses ambientes (MORAES, 2014). A cepa *Burkholderia cepacia*, a primeira a ser descrita do gênero *Burkholderia*, é um patógeno oportunista em pacientes com fibrose cística, porém outras cepas do complexo também já foram descritas como complicadoras do quadro de pacientes acometidos com esta doença (VIÑAS, 2015).

Tabela 8: Antibiograma das cepas Gram-negativas

Antimicrobiano	***Burkholderia arboris***	***Burkholderia* sp.**	***Moraxella* sp.**
AMI 30	R	R	S
AMC 30	R	R	R
AMP 10	R	R	R
ATM 30	R	R	R
CFZ 30	R	R	R
CPM 30	R	R	I
CFO 30	R	R	R
CAZ 30	S	R	I
CRO 30	R	R	R
CIP 05	I	I	I
CLO 30	I	I	I
GEN 10	R	R	R
MPM 10	I	R	S
SUT 25	R	I	R
TET 30	R	R	S

Legenda: Amicacina 30 µg (AMI 30), Amoxilina/ Ácido clavulânico 30 µg (AMC 30), Ampicilina 10 µg (AMP 10), Aztreonam 30 µg (ATM 30), Cefazolina 30 µg (CFZ 30), Cefepime 30 µg (CPM 30), Cefoxitina 30 µg (CFO 30), Ceftazidima 30 µg (CAZ 30), Ceftriaxona 30 µg (CRO 30), Ciprofloxaxina 5 µg (CIP 05), Cloranfenicol 30 µg (CLO 30), Gentamicina 10 µg (GEN 10), Meropenem 10 µg (MPM 10), Sulfazotrim 25 µg (SUT 25), Tetraciclina 30 (TET 30). R: Resistente, I: Intermediario, S: Sensível. Fonte: Manual para Antibiograma (Laborclin. 2011)

A cepa *Moraxella* sp. foi resistente a 8 antibióticos (amoxilina/ ácido clavulânico amicacina, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefoxitina, ceftriaxona, gentamicina e sulfazotrim), intermediária a 4 (cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina, cloranfenicol) e sensível a 3 (amicacina, meropenem e tetraciclina).

O gênero *Moraxella* faz parte da família Moraxellaceae, junto com os gêneros *Psychrobacter*, *Alkanindiges*, *Paraperlucidibaca*, *Acinetobater* e *Perlucidibaca* (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2014). Muitas das espécies pertencentes a esta família são na maioria ambientais, enquanto algumas possuem importância clínica por serem patógenos oportunistas, como é o caso de cepas do complexo *Acinetobacter baumanii* – *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella catarrhalis* e *Moraxella bovis* (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2014). *M. catarrhalis* é uma cepa patógena humana, e *M. bovis* um patógeno animal. Estudos mostram que *M. catarrhalis* possui uma enzima chamada BRO que confere proteção contra antibióticos β-lactâmicos, e até mesmo contra outras cepas patógenas do trato respiratório como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2014 *apud* VERDUIN et al. 2002). HARE e colaboradores apontam que a resistência a antibióticos de cepas de *Moraxella catarrhalis* são diferentes em regiões distintas do mundo e são dependentes do método, por exemplo, maiores taxas de resistência foram relatadas na região Ásia-Pacífico (25 % resistente ao cefaclore 12 % para cefuroxima) (HARE et al., 2019 *apud* BELL et al., 2009). Em estudos feitos na Europa, Estados Unidos e América Latina entre 2009 e 2011, foi isolado menos de 1 % de cepas de *M. catarrhalis* resistente a antibióticos macrólidos (FLAMM et al., 2012), em contraste com cepas isoladas da China, que tinham entre 5 – 10 % de cepas resistentes (WANG et al., 2011; FLAMM et al., 2012).

GODHEJA e colaboradores (2014) apontam que pode existir uma relação entre a resistência a antibióticos e a degradação de hidrocarbonetos, bem como a tolerância a metais pesados/degradação de hidrocarbonetos (GODHEJA et al., 2014). BHATTACHARYYA e colaboradores (2019) analisaram a distribuição de genes de resistência a antibióticos (ARG) que foram extraídos de bactérias isoladas de mangue-

zais da Índia, e concluíram que existe a possibilidade da relação entre a distribuição e abundância dos ARG e das cepas resistentes a antibióticos com as concentrações de metais pesados e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos naquela região de mangue. A ação antrópica nessa região é a principal causadora da poluição (metais pesados e HPA's) e eventuais adaptações da microbiota nativa (BHATTACHARYYA et al., 2019).

RODGERS e colaboradores (2019) relacionam os efeitos da poluição urbana, o impacto nos rios e nos estuários com o despejo de substâncias xenobióticas como os HPA's e metais pesados, e o aumento da resistência microbiana a antibióticos. De acordo com os autores o contato da microbiota com estas substâncias estaria sendo um fator de estresse e induzindo o aumento da resistência, além de tornar o ambiente poluído nocivo para a população. Então, esse estresse seleciona as populações de microrganismos capazes de sobreviver às mudanças no seu habitat, que neste caso é a poluição por HPA's e metais pesados, e essa característica irá se perpetuar por gerações e criar um resistoma aprimorado. O estudo de CHEN e colaboradores (2017) aponta o aumento da abundância de bactérias do filo Proteobacteria em solos contaminados por HPA's e da expressão de genes de resistência a antibióticos. Os principais genes encontrados estão relacionados a bombas de efluxo de antibióticos aromáticos nos cromossomos desses organismos. Os autores sugerem também que os plasmídeos não são necessariamente os vetores de transferências desses genes de resistência a antibióticos. Os mecanismos moleculares relacionados com o uso de hidrocarbonetos pelas bactérias e a resistência aos antibióticos não estão totalmente esclarecidos.

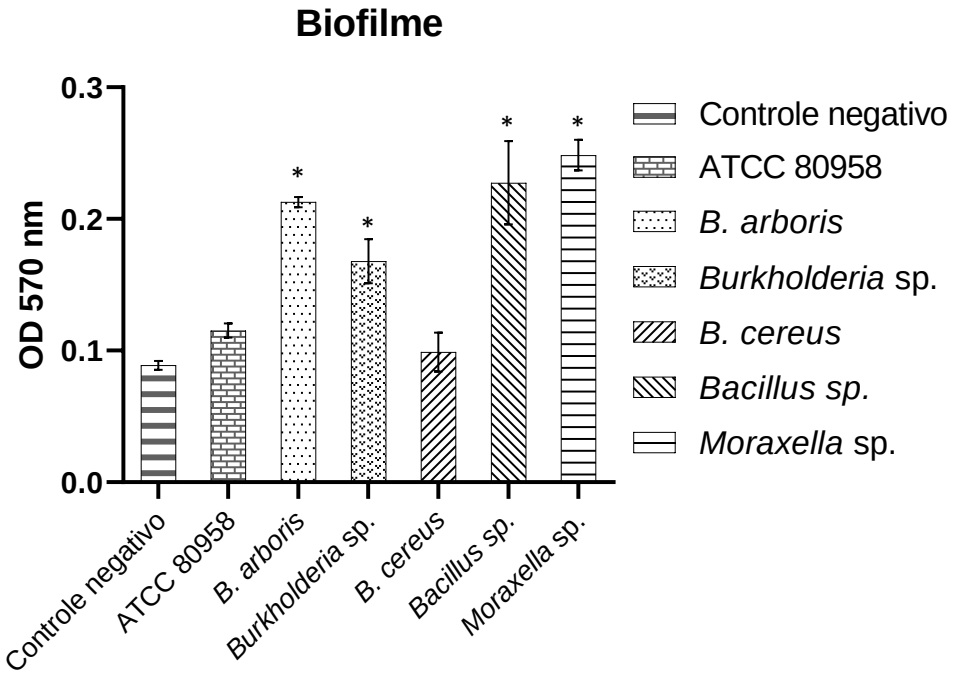
As cepas avaliadas neste trabalho não possuem registro de patogenicidade em humanos, com exceção de *B. cereus*. Entretanto algumas possuem resistência a parte considerável dos antibióticos testados. Considerando a aplicação futura em biorremediação, é notável a necessidade de baixo impacto ambiental, além de reduzir a chance de surgirem problemas de saúde pública. O uso da engenharia genética pode viabilizar o silenciamento de genes de resistência a antibióticos, bem como a melhoria na degradação de hidrocarbonetos pelas cepas. No trabalho de FLANNAGAN e colaboradores (2008) os genes de resistência à múltiplas drogas de um *óperon* da cepa *Burkholderia cenocepacia* K56–2 foram eliminados para que a

cepa fosse utilizada na biorremediação. Para isso, são necessários estudos genômicos para que seja concretizada a modificação desejada nas cepas resistentes deste trabalho, uma alternativa que aumenta as chances do uso dessas espécies na biorremediação.

5.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME

Os resultados para o teste de produção de biofilme constam na figura 8. Dentre as 5 cepas testadas, apenas *B. cereus* apresentou valor abaixo do controle positivo (ATCC 80958), porém os valores são próximos. As cepas *B. arboris* (média: 0,212; D.P.± 0,00), *Burkholderia sp*. (média: 0,167; D.P. ± 0,01), *Bacillus* sp (média: 0,227; D.P. ± 0,03) e *Moraxella* sp. (média: 0,248; D.P. ± 0,01) exibiram valores acima do controle positivo, indicando a formação do biofilme na placa de poliestireno. As análises estatísticas mostraram diferença significativa entre as amostras testadas ($p < 0,05$) entre estas quatro cepas e o controle negativo (média: 0,088; D.P. ± 0,00) e o controle positivo (média: 0,115; D.P. ± 0,00), com exceção de *B. cereus* (média: 0,098; D.P. ± 0,03) ($p > 0,05$).

Figura 8: Capacidade de formação de biofilme pelas cepas *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. e *Moraxella* sp. em placas de poliestireno. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatísticas significativas (p < 0,05) entre os controles e as cepas bacterianas



Fonte: A Autora (2020)

Espécies de *Burkholderia* já foram descritas como formadoras de biofilme, como as espécies *Burkholderia pseudomallei* (HADPANUS et al., 2019), *B. multivorans*, *B. cenocepacia* e *B. dolosa* (CARAHER et al., 2006). A formação do biofilme em espécies do complexo *Burkholderia cepacia* é uma característica que pode favorecer a patogenicidade e a resistência à antibióticos nessas cepas (CARAHER et al., 2006).

Tem sido relatado que espécies de *Bacillus* produzem biofilme. Nestes estudos também são detalhadas as características químicas e a influência do biofilme na sobrevivência dessas bactérias. No estudo de WIJMAN e colaboradores (2007) foi demonstrado que diferentes linhagens de *Bacillus cereus* possuem a capacidade de formar biofilme na interface ar-líquido em intervalos de tempos distintos, de acordo com o substrato no cultivo. Relataram também, além da contribuição dos esporos para a formação do biofilme e aderência das bactérias no substrato. Em estudos como o de OOSTHUIZEN e colaboradores (2001; 2002), a utilização da proteômica viabilizou a caracterização do biofilme de cepas de *Bacillus cereus*, e o quão diferencial é a expressão de proteínas na formação desse biofilme (OOSTHUIZEN et al., 2001; OOSTHUIZEN et al., 2002). A proteômica também contribuiu no estudo de BRANDA e colaboradores (2006) com cepas de *Bacillus subtilis*, onde a proteína TasA é uma das principais contribuintes na formação do biofilme, tanto em cepas selvagens como mutantes.

Cepas de *M. catarrhalis* produtoras de biofilme já foram relatadas na literatura, e esta característica seria um fator de virulência, visto que esta cepa é responsável por causar doenças no trato respiratório e o biofilme estaria contribuindo para a adesão das células nas mucosas nasofaríngeas humanas (VIDAKOVICS; RIESBECK, 2009; AEBI, 2011). Em um estudo de ELY (2018) com cepas de *M. bovis*, *M. ovis* e *M. bovoculi* isoladas dos olhos de animais com ceratoconjutivite infecciosa, foi observado que ambas as espécies são capazes de formar biofilme, e isso permite a aderência à córnea dos animais, além de resistirem à atividade da lisozima, causando o desenvolvimento da doença em questão.

O biofilme traz uma série de vantagens aos microrganismos, por exemplo, fortalece o crescimento bacteriano no agregado, facilita a captação e transferência de nutrientes e biomoléculas e aderência a substratos bióticos e abióticos (SINGH et al., 2006). Então, pode-se pensar que os biofilmes podem ser uteis em processos de

biorremediação, principalmente mediadas por microrganismos plactônicos. Segundo SINGH e colaboradores (2006), as células bacterianas que vivem agregadas em biofilmes tem maior chance de sobreviver a estresses causados por contaminantes, além de terem o aumento da degradação desses contaminantes, pois o biofilme acelera a imobilização desses compostos, facilitando a incorporação pelas bactérias.

Existem trabalhos que demonstram o uso de biofilmes bacterianos para biorremediação de metais pesados, como o zinco, cádmio e níquel (CHANG et al., 2006), cobalto (TRAVIESO et al., 2002), cobre (DIELS et al., 2003), entre outros. A biorremediação de hidrocarbonetos utilizando biofilmes também já foi e está sendo estudada em biorreatores e em diferentes condições experimentais. A remoção do tolueno foi cerca de 84 % eficiente utilizando biofilme de bactérias aeróbias e anaeróbias em um biorreator (ARCANGELI et al., 1995; PARVATIYAR et al., 1996; SINGH et al., 2006). Cepas de *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Polaromonas* sp., entre outras foram algumas das bactérias utilizadas na remoção de clorofenóis, como o 2-clorofenol e o pireno (PUHAKKA et al., 1995 e ERIKSSON et al., 2002 *apud* SINGH et al., 2006).

As bactérias *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. podem ser melhor exploradas quanto à degradação de diesel, visto que todas produzem biofilme, e este pode estar relacionado com a degradação de hidrocarbonetos. E ainda, a utilização dessas espécies em um novo consórcio pode viabilizar um cenário mais favorável com relação a degradação do óleo diesel, onde as cepas possam colaborar entre si para uma performance mais satisfatória.

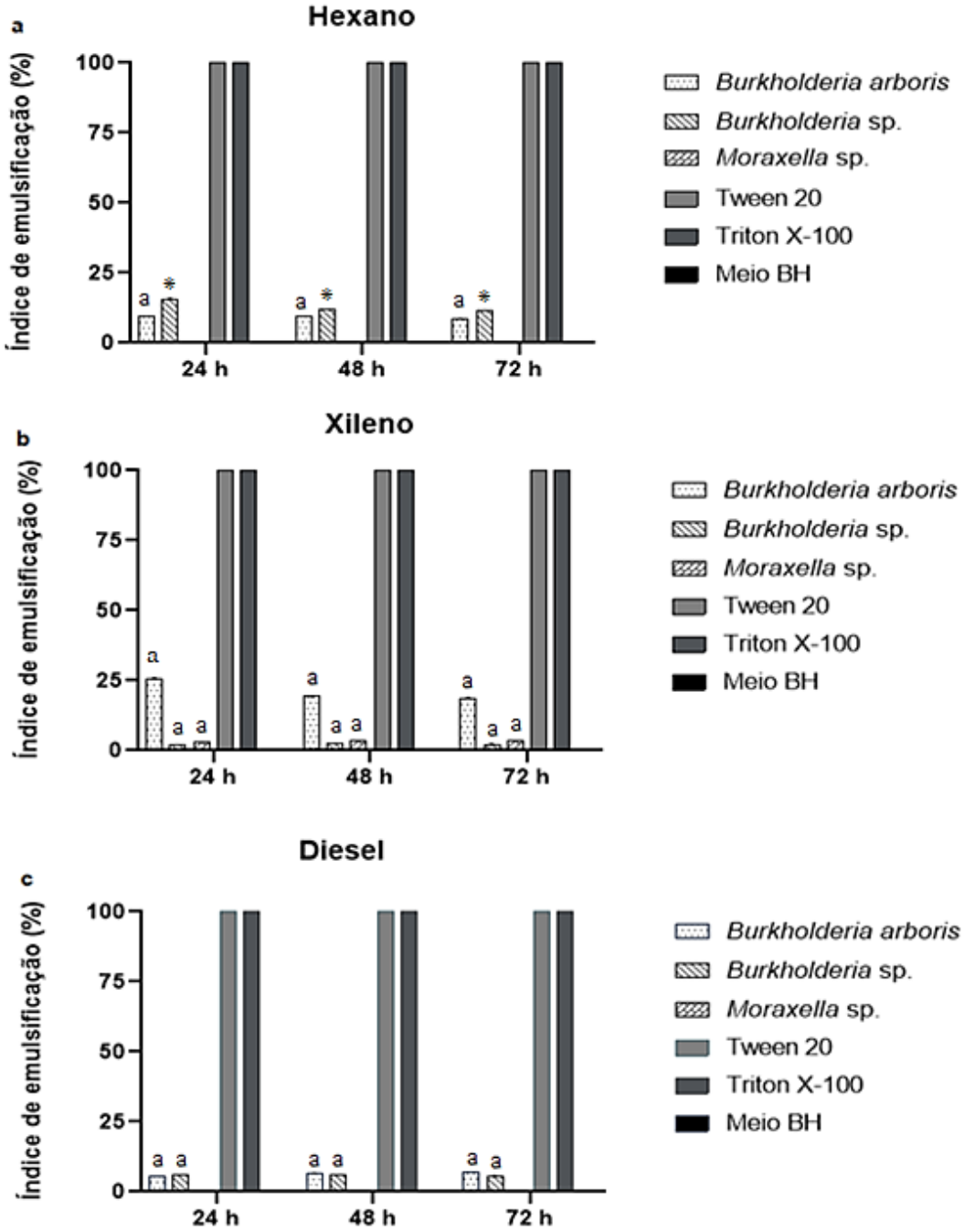
5.3 ATIVIDADE EMULSIFICANTE

As cepas *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp., embora tenham sido isoladas previamente na presença de diesel como fonte de carbono, perderam este fenóptipo. Como não cresceram no meio BH + diesel 1 % enquanto incubadas como pré-inóculo, não foram utilizadas nos testes subsequentes. A figura 8 contém os resultados do teste de emulsificação com as cepas *Burkholderia arboris*, *Burkholderia sp.* e *Moraxella* sp.

Nos três intervalos experimentais, o maior índice de emulsificação de *B. arboris* foi do xileno (25,79 %; D.P. ± 0,13) em 24 h. O segundo foi o do hexano (9,72 %; D.P.

± 0,02) em 48 h, e menor foi o do diesel (7,05 %; D.P. ± 0,01) em 72 h. Já a cepa *Burkholderia* sp. obteve índice maior com relação ao hexano (15,80 %; D.P. ± 0,06, 24 h). O índice de emulsificação do diesel foi 6,14 % (D.P. ± 0,01) em 24 h, e do xileno 2,68 % (D.P ± 0,00) em 48 h. *Moraxella* sp. não emulsificou o hexano e o diesel, e apresentou índices de 3,20 % (D.P. ± 0,00) em 24 h e 3,62 % (D.P. ± 0,00) em 48 e 72 h para o xileno.

Figura 9: Atividade emulsificante com as cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. Solvente utilizados: hexano (a), xileno (b) e diesel (c). Os índices de emulsificação são dados em porcentagem (%). A letra "a" indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os intervalos de acordo com o solvente e o asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os mesmos



Fonte: A Autora (2020)

As análises estatísticas mostraram que, com relação aos tempos experimentais no teste com *B. arboris*, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os índices de emulsificação (E %), bem como para hexano, xileno e diesel. Para a cepa *Burkholderia* sp., houve diferença entre os tempos experimentais apenas para o hexano ($p < 0,05$). E por fim, a cepa *Moraxella* sp. não apresentou diferença estatística significativa com relação aos índices obtidos no xileno ($p > 0,05$).

Relatos da literatura com cepas do gênero *Burkholderia*, como o da cepa *Burkholderia glumae*, mostrou que esta espécie foi capaz de degradar hidrocarbonetos e substratos oleosos, e apresentou índices de emulsificação (E24) de 44,5 % em hexadecano, 61,5 % em tolueno e 100 % em óleo de motor (COSTA et al., 2011). SARKAR e colaboradores isolaram cepas de bactérias, entre elas cepas de *Burkholderia* sp., onde essas cepas degradavam hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (SARKAR et al., 2017). ALMATAWAH (2017) avaliou o potencial de degradação de óleo cru de uma cepa de *Burkholderia cepacia* isolada de solos contaminados. Os testes revelaram que a cepa foi capaz de produzir biossurfactantes, além de emulsificar outros tipos de óleo e com índices razoáveis, como 30,9 % para o diesel, 30 % para o hexadecano, 32 % para o xileno (ALMATAWAH, 2017). Estas características são desejáveis para inserir cepas como estas na biorremediação, pois essas características (capacidade de degradar e emulsificar hidrocarbonetos) podem ser otimizadas com a aplicação de técnicas como a bioaumentação, e além do uso da cepa em consórcios bacterianos, haja vista a diferença significativa na taxa de emulsificação de hidrocarbonetos.

Estudos com uma cepa de *Moraxella* sp. mostraram que o índice de emulsificação em diesel era de 24 %, 14 % em xileno e índice nulo em hexano (RAHMAN et al., 2003). DULCINI (2002) isolou bactérias de sítios contaminados por derivados de petróleo, entre elas uma cepa de *Moraxella nonliquefaciens*, e testou sua capacidade de degradar tolueno, xileno e benzeno, além de avaliar a capacidade de emulsificar esses hidrocarbonetos e produzir biossurfactantes. A cepa *Moraxella nonliquofaciens* foi capaz de tolerar altas concentrações desses hidrocarbonetos, porém não apresentou índices de emulsificação e nem indícios de produção de biosurfactantes, diferente de algumas cepas testadas no trabalho.

As emulsões são sistemas cineticamente estáveis, e sua aparência, estrutura e estabilidade dependem das características químicas e físicas da sua composição (JAHAN et al., 2019). Os biossurfactantes são capazes de formar microemulsões e diminuem a tensão superficial na interface água-óleo (ALEXANDRIDIS et al., 1995; BODRATTI et al., 2017 *apud* JAHAN et al., 2019). Os bioemulsificantes também possuem cacidade de formar emulsões, tornando líquidos imiscíveis em água mais solúveis, e devido a característica química dessas moléculas, que inclui uma mistura de polissacarídeos, ácidos graxos e proteínas, as emulsões se tornam muito mais estáveis (UZOIGWE et al., 2015).

As interações de compostos hidrofóbicos com as proteínas e polissacarídeos são importantes na formação de emulsões, pois os sítios hidrofóbicos das proteínas podem interagir com os hidrocarbonetos reversivelmente, enquanto os polissacarídeos ancoram nas proteínas para formar emulsões de óleo em água estáveis (KAPLAN et al., 1987 *apud* UZOIGWE et al., 2015). A produção dessas moléculas e sua consequente ação na degradação de hidrocarbonetos pode ser fundamental para as bactérias habitantes de ambientes contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo, pois permite a adaptação e sobrevivência desses organismos a estes ambientes, além de beneficiá-las com o uso destes compostos como fonte de carbono para seu metabolismo.

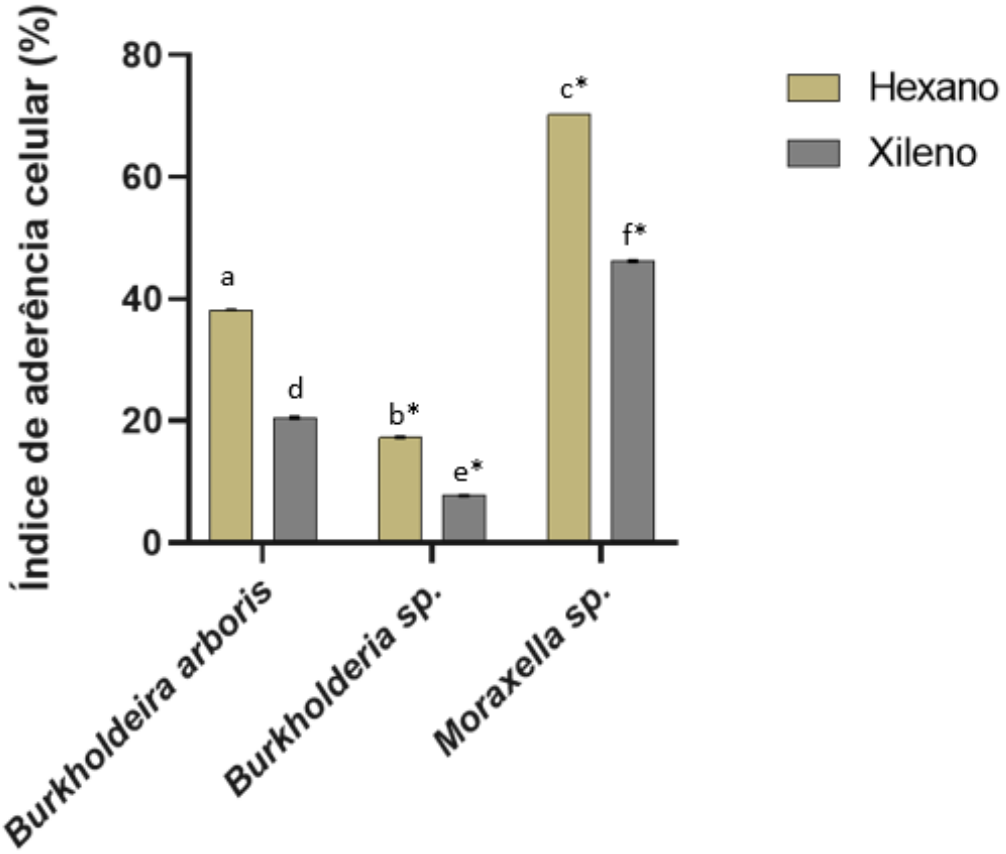
De acordo com os resultados obtidos, *B. arboris* e *Burkholderia* sp. possuem a capacidade de produzir bioemulsificantes, enquanto *Moraxella* sp. pode estar produzindo estas moléculas em baixa quantidade, ou até mesmo os bioemulsificantes produzidos não sejam capazes de emulsificar os solventes orgânicos testados, no caso o hexano e o diesel, até mesmo devido à polaridade destes solventes. Pelo fato de *Bukholderia* sp e *Moraxella* sp. terem sido isoladas de consorcio, é provável que exista co-metabolização dos componentes do óleo diesel, bem como a influência disto na produção de bioemulsificantes, e isoladamente as cepas possam não estar produzir essas moléculas em quantidades detectáveis.

5.4 HIDROFOBICIDADE CELULAR

Na figura 10 consta o resultado do teste de hidrofobicidade celular das cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. *B. arboris* teve maior índice de hidrofobicidade celular em hexano (média: 38,26 %; D.P.± 0,04), assim como *Moraxella* sp. (média: 70,28 %; D.P. ± 0,00), enquanto *Burkholderia* sp. obteve um

índice de 17,32 % (D.P. ± 0,14) neste solvente. O maior índice em xileno foi o da espécie *Moraxella* sp. (média: 46,22 %; D.P. ± 0,14), enquanto *B. arboris* apresentou um índice de 20,53 % (D.P. ± 0,14) e *Burkholderia* sp. de 7,75 % (D.P. ± 0,09). O percentual de aderência celular de bactérias testadas do gênero *Burkholderia*, isoladas de sedimentos marinhos próximos a um campo de refino de petróleo na Índia em hidrocarbonetos de fase não-aquosa (n-hexadecano, 1,2-dicloroetano etc.) foi entre 10 e 80 % (CHAKRABORTY et al., 2010). A cepa *B. cepacia*, mais estudada por ser um patógeno oportunista, teve aderência de 89 % em n-hexadecano (MOHANTY; MUKHERJI, 2008). Esta foi isolada de sedimentos marinhos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo na Índia.

Figura 10: Índices de hidrofobicidade celular (%) para hexano e xileno. As letras (a, b, c) indicam: diferença significativa ($p < 0,05$) dos índices do hexano entre as cepas; diferença significativa ($p < 0,05$) dos índices do xileno entre as cepas (d, e, f). Os asteriscos (*) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os solventes testados na cepa em questão



Fonte: A Autora (2020)

Os registros de índices de hidrofobicidade celular em hidrocarbonetos para cepas do gênero *Moraxella* são escassos, porém um estudo com a cepa patogênica *Moraxella catarrhalis* mostra que os índices de aderência ao xileno em cepas selvages

foram entre 15 e 25 %, enquanto nas cepas mutantes foram entre 80 % e 90 % (SAITO et al., 2013).

As mudanças causadas pela poluição ambiental por compostos xenobióticos oriundos dos grandes centros urbanos, meios de transporte, entre outros, fazem com que os microrganismos desenvolvam mecanismos os quais levam a adaptação em prol da sua sobrevivência. Alterações na superfície celular, como o aumento ou diminuição da hidrofobicidade celular, permitem que as bactérias habitantes de locais contaminados por hidrocarbonetos possam tolerá-los e/ou incorpoáa-los. As bactérias se ligam às gotículas de hidrocarbonetos e os levam da água para a fase orgânica, onde biossurfactantes e enzimas decompõem os resíduos (KACZOREK et al., 2008; KRASOWSKA, SIGLER, 2014). A interações hidrofóbicas que ocorrem entre a célula bacteriana e os hidrocarbonetos acontecem quando não é possível formar ligações de hidrogênio com moléculas da água ou mesmo interagir eletrostaticamente (MAGNUSSON, 1980; CEO et al., 2019). Isso contribui para que a célula bacteriana se torne hidrofóbica, em resposta a fatores ambientais e estressores.

Os níveis de hidrofobicidade celular podem permitir a adesão de bactérias em superfícies bióticas e abióticas, e isso vai variar de acordo com a espécie, o ambiente, fatores físico-químicos, entre outros (KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Altos níveis de hidrofobicidade celular podem garantir maior adesão e degradação de compostos com alta hidrofobicidade, como tolueno (KOBAYASHI et al.,1999; KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Por outro lado, bactérias que possuem menores níveis de hidrofobicidade possuem maior resistência à efeitos tóxicos causados por esses solventes, pois diferente de organismos hidrofóbicos, eles não acumulam essas substâncias devido a camada de lipopolissacarideos presente na membrana celular externa (KOBAYASHI et al., 1999; KRASOWSKA; SIGLER, 2014). A cepa *Moraxella* sp. foi mais hidrofóbica para os dois solventes testados, enquanto as cepas de *Burkholderia* obtiveram níveis de hidrofobicidade menores, porém compatíveis com os dados da literatura. Por serem bactérias isoladas de consórcios, onde a contribuição e características individuais das mesmas não poderiam ser avaliadas, os dados mostram a capacidade de adesão frente a hidrocarbonetos diferentes, sendo satisfatórios e contribuindo para maior conhecimento sobre o comportamento destas espécies amazônicas *in vitro*.

Os compostos ativos de superfície (CAS) são conhecidos como biossurfactantes e bioemulsificantes. A habilidade das bactérias em produzir estas

moléculas geralmente é associada com a capacidade destes microrganismos de utilizar fontes de carbono imiscíveis em seu metabolismo, pois muitos desses compostos podem ser intracelulares, extracelulares ou ligados à superfície celular (FRANZETTI et al., 2010). Os compostos ligados à superfície podem controlar a hidrofobicidade da célula bacteriana, pois expondo sua parte hidrofóbica para o exterior da célula e facilita assim a captação de hidrocarbonetos para a célula, atuando como reguladores da hidrofobicidade celular (NEU, 1996; FRANZETTI et al., 2010). A liberação de biossurfactantes influencia na aderência da célula bacteriana a hidrocarbonetos, como por exemplo, no trabalho de AL-TAHHAN e colaboradores (2000), onde verificou-se que os ramnolipidios produzidos por *Pseudomonas* spp. causaram a liberação de LPS, aumentando a hidrofobicidade celular e a incorporação eficiente de hexadecano (AL-TAHHAN et al., 2000 *apud* FRANZETTI et al., 2010). A priori, é possível que as bactérias estejam produzindo algum tipo de biossurfactante que esteja facilitando a adesão aos hidrocarbonetos e aumentando a hidrofobicidade celular, mas não necessariamente a produção dessas moléculas explica a adesão bacteriana e os índices de hidrofobicidade celular em sua totalidade.

Os índices de hidrofobicidade celular obtidos dá suporte aos demais testes na avaliação das espécies bacterianas, para que a (s) cepa (s) com maiores índices possa ser selecionada para estudos avançados dentro da proposta de biorremediação, e mesmo para a melhor compreensão da capacidade das cepas isoladas dos consórcios de degradar o óleo diesel e seus constituintes. Os resultados obtidos demonstraram que as cepas são capazes de se aderir ao hexano e ao xileno. Comparando estes dados com os resultados obtidos nos testes de emulsificação (figura 9), é possível que quando cultivadas em consórcio, a cepa *Moraxella sp* tenha contribuição devido a sua maior capacidade de aderência aos hidrocarbonetos durante a degradação do diesel, enquanto as cepas do gênero *Burkholderia* tenham maior contribuição com a produção de bioemulssificantes.

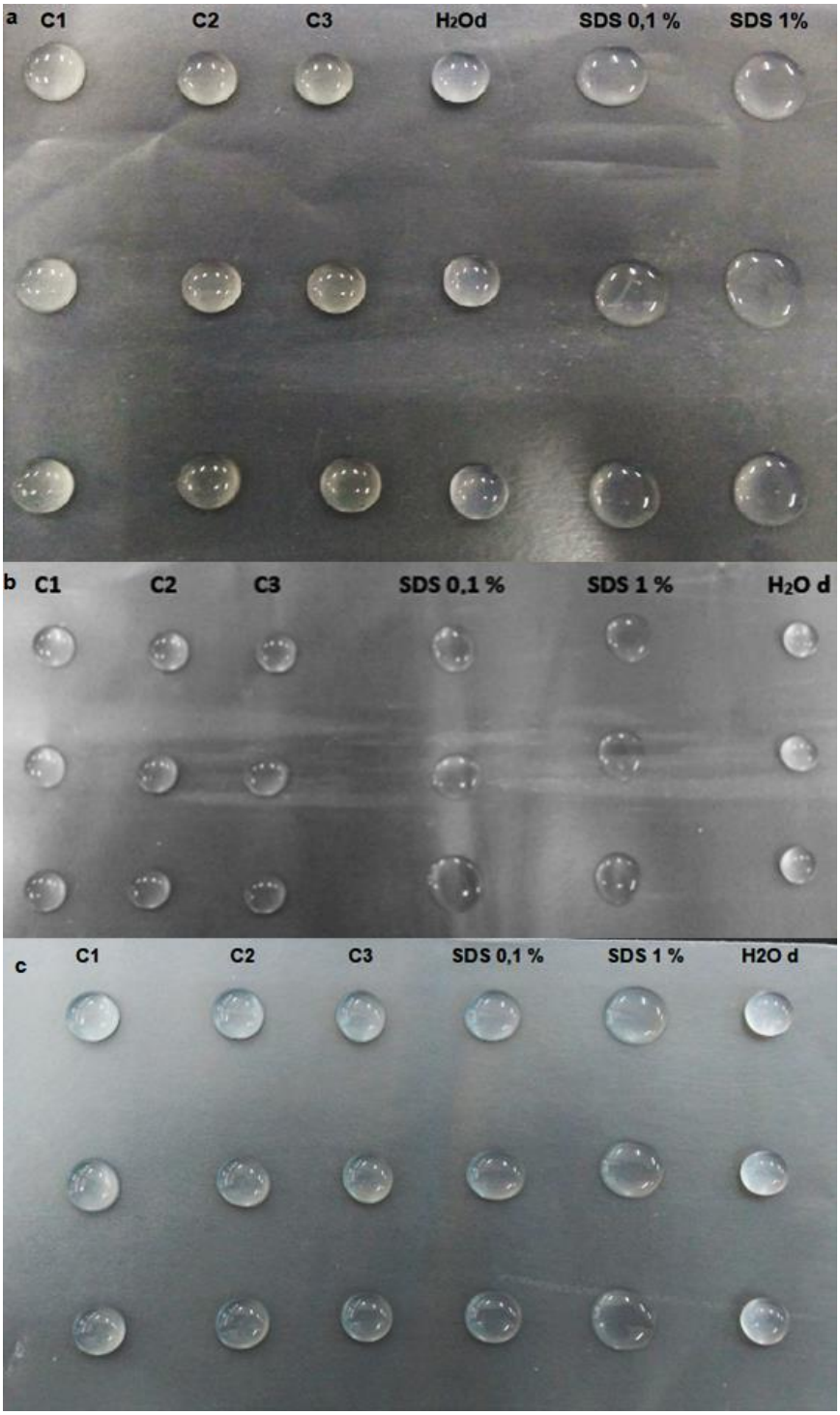
5.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

O teste de detecção de produção de biossurfactantes, ou colapso de gota, tem por finalidade avaliar qualitativamente a capacidade do microrganismo de produzir biossurfactantes, utilizando um método visual do espalhamento da gota do sobrenadante da cultura. Esse teste foi utilizado pela primeira vez em 1991, por JAIN e colaboradores (1991) e ainda é utilizado, podendo contar com auxílio do tensiôme-

tro, equipamento que mede a tensão superficial.

Na figura 11 é mostrado o resultado do teste com as cepas *B. arboris* (a), *Burkholderia sp.* (b) *e Moraxella* sp. (c).

Figura 11: Produção de biossurfactantes de *B. arboris* (a), *Burkholderia* sp. (b) e *Moraxella* sp. (c). Uso de alíquotas de 135 µL de sobrenadante filtrado. Legenda: C1: cultura 1; C2: cultura 2; C3: cultura 3; H2Od: água destilada (controle negativo); SDS 0,1 % e SDS 1 %: controles positivos



Fonte: A Autora: 2020

O espalhamento da gota das culturas (C1, C2 e C3, réplicas biológicas) de *B. arboris* se assemelha ao controle negativo, a água destilada. Portanto, pode indicar que esta cepa não tem indícios de produção de biossurfactantes de acordo com as condições estabelecidas. De acordo com resultado da cepa *Burkholderia* sp. (b), de modo geral, ao comparar o espalhamento da gota, é possível perceber a semelhança com o controle negativo, portanto dando indícios de não produção de biossurfactantes também. Estudos com uma cepa de *Burkholderia gladioli* isolada de sedimentos de mangue e do rio foi capaz de produzir biossurfactantes em função de concentrações diferentes de fontes de carbono (glicose, óleo de cozinha) adicionadas ao meio de cultura (CATTER et al., 2016). Uma cepa de *Burkholderia cenocepacia* BSP3 isolada de solos contaminados por óleo produziu um biosurfactante glicolipidico capaz de reduzir a tensão superficial de três pesticidas (paration metílico, paration etílico e trifluralina), além de conseguir emulsificar óleos diversos (WATTANAPHON et al., 2008). Em outro estudo, com a espécie *Burkholderia* sp. isolada de solos contaminados por HPA's foi capaz de produzir um novo biossurfactante ramnolipídico, Rha C16-C16, oriundo da degradação do óleo diesel (MOHAMMED et al., 2018). Apesar de parecer um contraste com a literatura, existe a possibilidade de que em um período de cultivo superior ao testado, as bactérias do gênero *Burkholderia* possa mostrar indícios ou mesmo produzir moléculas biossurfactantes. As concentrações do óleo diesel também poderiam ser modificadas, a fim de induzir a produção destas biomoléculas.

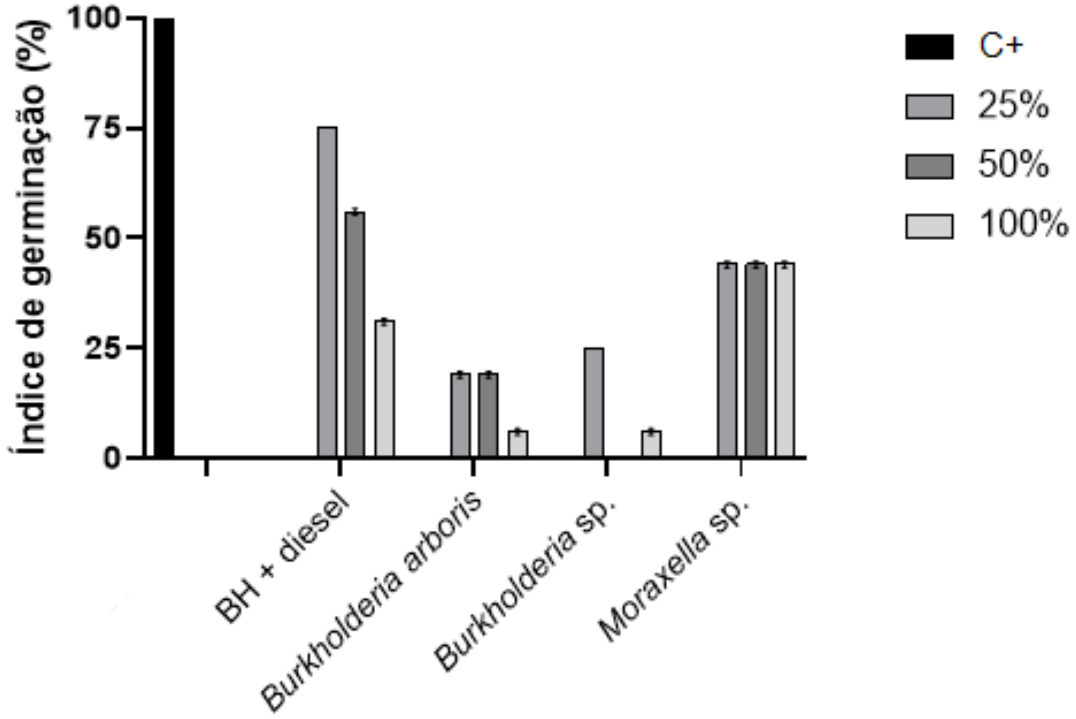
Com o resultado teste realizado com a cepa *Moraxella* sp. (c) é possível perceber que gotas extraídas do sobrenadante da cultura apresentam uma discreta similaridade com o controle positivo SDS 0,1 %, podendo indicar a produção de biossurfactantes pela cepa em questão. Estudos com bactérias do gênero *Moraxella*, como o de BANAT e colaboradores (2002) mostraram que a cepa de *Moraxella* sp. DS1-13 possuía capacidade de crescer em petróleo e derivados, além de produzir biossurfactantes (BANAT et al., 2002). Demais registros na literatura sobre produção e identificação química de biossurfactantes produzidos por espécies do gênero *Moraxella* são escassos.

5.6 TESTE DE FITOTOXICIDADE UTILIZANDO *Lactuca sativa*

O teste foi realizado com as cepas *Burkholderia arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. e os resultados são apresentados na figura 12. Para o controle negativo

para toxicidade (H_2O destilada) observou-se índice de germinação igual a 100 %. Para o controle positivo de toxicidade (BH + 1 % de diesel) os índices de germinação foram iguais a 75 %, 56 % e 31 %, para as concentrações de BH-diesel de 25 %, 50 % e 100 %, respectivamente, sendo observado um decréscimo de germinação de acordo com o aumento de concentração do meio BH/diesel, como esperado. Os índices acima de 50 % de germinação, contudo abaixo do índice do controle (H2O destilada) indicam que existe influência de componentes do meio BH com óleo diesel na germinação das sementes.

Figura 12: Teste de fitotoxicidade utilizando *Lactuca sativa*. Sementes de *L. sativa* foram incubadas em sobrenandante de cultura de 5 dias de cultivo das cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp. para germinação. Em cada ensaio foram utilizadas 10 sementes de *L. sativa* mantidos em repouso sob constante iluminação por 7 dias. As diluições de meio BH/diesel e sobrenadante de cultura são indicados na figura, à direita. Legenda: C+: controle positivo para germinação



Fonte: A Autora (2020)

Os índices do IGN estão indicados na tabela 9. O meio BH + diesel na concentração 25 %, o índice indicou baixa toxicidade, o que muda a partir de 50 %, indicando a influência de componentes do meio BH e/ou do óleo diesel na toxicidade do meio, tendo em vista a composição complexa do diesel e a concentração utilizada nos testes.

Tabela 9: Índices do IGN das cepas *B. arboris*, *Burkholderia* sp. e *Moraxella* sp e do controle BH + diesel em diferentes concentrações, e nível de toxicidade segundo os índices do IGN

Controle/Cepa	Concentrações teste	IGN (%)	Nível de toxicidade
BH + diesel	25 %	-0,25	Baixa
	50 %	-0,4375	Moderada
	100 %	-0,6875	Alta
Burkholderia arboris	25 %	-0,8125	Muito alta
	50 %	-0,8125	Muito alta
	100 %	-0,66667	Alta
***Burkholderia* sp.**	25 %	-0,75	Alta
	50 %	-	-
	100 %	-0,9375	Muito alta
Moraxella sp.	25 %	-0,5625	Alta
	50 %	-0,5625	Alta
	100 %	-0,5625	Alta

Fonte: A Autora (2020)

A cepa *B. aboris* apresentou índices de germinação de 19 %, 19 % e 6 % para as concentrações 25 %, 50 % e 100 %, respectivamente. Com relação ao IGN, em todas as concentrações foram observados níveis altos de toxicidade (vide tabela 11), que podem ser relacionados com os baixos índices de germinação obtidos. Comparando as concentrações 25 e 50 % do controle, observa-se uma diferença considerável tanto nos índices de germinação quanto aos níveis de toxicidade.

A cepa *Burkholderia* sp. obteve índices de germinação de 25 % (na concentração de 25 %) e 6 % (na concentração 100 %). Os resultados obtidos do teste na concentração 50 % foram desconsiderados, pois ocorreu contaminação nas placas. Os valores do IGN indicaram alta toxicidade nas duas concentrações testadas. Em comparação a *B. arboris*, o índice na concentração 25 % foi maior e em 100 % se observou os mesmos valores. Em contrapartida, os índices permanecem abaixo dos obtidos no controle, bem como para *B. arboris.*

Moraxella sp. apresentou índice de 44 % de germinação em todas as concentrações. O valor obtido foi superior aos das cepas *B. aboris* e *Burkholderia* sp. e ao controle a 100 %, porém menor comparado aos índices do controle em concentrações menores (25 e 50 %). Os valores do IGN indicaram alta toxicidade, comparável s duas outras cepas testadas e o controle a 100 %.

O estudo de MONTAGNOLLI e colaboradores (2015) avaliou a germinação de sementes de alface (*L. sativa*) expostas a águas residuais contaminadas por petróleo

antes e depois da biodegradação por *Bacillus subtilis*. Os resultados mostraram que antes da biodegradação, as taxas de germinação variaram entre 60 e 85 %, com exceção do fenol, onde não houve germinação. Após a biodegradação, verifica-se uma diminuição da germinação, onde na gasolina não houve mais germinação, e as taxas do diesel, óleo cru e óleo de motor caem variando entre 50 e 70 % (MONTAGNOLLI et al., 2015). Os autores relacionam a absorção de compostos derivados do petróleo nos tecidos vegetais com a taxa de germinação, pois as diferentes concentrações e estrutura química do composto podem causar danos teciduais no embrião e impedir a germinação da radícula da semente (AYERS; WESTCOT, 1999; SANCEY et al., 2011 *apud* MONTAGNOLLI et al., 2015). Além disso, os autores observaram que os hidrocarbonetos de baixo peso molecular presentes na gasolina e no diesel tiveram intenso efeito tóxico, devido à sua alta solubilidade e presença de moléculas mais voláteis com capacidade de penetrar nas células e alterar estruturas celulares (MONTAGNOLLI et al., 2014 *apud* DU et al., 2012; HARWOOD et al., 2013; LUO et al., 2014).

De um modo geral, é possível observar que as bactérias liberaram subprodutos mais tóxicos que o diesel, bem como existe influência de componentes químicos do meio BH + diesel na germinação das sementes de alface. Considerando a complexidade química do óleo diesel e a capacidade das bactérias de biodegradar hidrocarbonetos, é possível que metabólitos tóxicos estavam presentes no meio após os dias de cultivo das bactérias, causando a inibição da germinação das sementes de alface, pois mesmo na menor concentração o meio causou baixa taxa de germinação, principalmente para *B. aboris* e *Burkholderia* sp.

6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, primeiramente com relação as cepas de *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp., foi possível observar que ambas são cepas sensíveis à maioria dos antibióticos testados e possuem a capacidade de formar biofilme. Devido a ambas terem perdido a capacidade de crescer em meio BH + diesel 1 %, não há resultados para o restante dos testes realizados.

As bactérias *Burkholderia arboris* e *Burkholderia* sp. tiveram resultados semelhantes: grande resistência a antibióticos, a capacidade de formar biofilme, de emulsificar hexano, xileno e diesel, também é capaz de se aderir ao hexano e xileno, não demonstraram indícios de produção de biossurfactante, e por fim, apresentaram baixos índices de germinação e alta toxicidade frente à germinação de sementes de *Lactuca sativa*.

A cepa *Moraxella* sp. possui resistência a 8 antibióticos e sensibilidade a 3, forma biofilme, foi capaz de emulsificar somente o xileno, é altamente aderente ao xileno e hexano, em comparação com as outras cepas, foi a única com indícios de produção de biossurfactantes. Obteve índices de germinação maiores do que as outras bactérias, e um alto nível de toxicidade frente à germinação de *L. sativa*.

É possível que estas bactérias estejam utilizando a capacidade de aderência aos hidrocarbonetos, bem como a formação do biofilme e a produção de bioemulsificantes em diferentes níveis para incorporá-los na célula e degradá-los. Existe a possibilidade de metabólitos oriundos da degradação de hidrocarbonetos estarem produzindo compostos tóxicos, porém demais estudos são necessários para confirmar o que de fato leva a toxicidade.

Com o perfil de degradação do óleo diesel e as características observadas das espécies bacterianas utilizadas neste trabalho, é possível inferir que dentro da perspectiva do uso das cepas futuramente para a biorremediação, a montagem de um novo consórcio é uma alternativa viável no sentido de facilitar e aumentar as taxas de degradação de hidrocarbonetos, pois as mesmas são oriundas de consórcio, então

pode ser que a colaboração entre espécies facilite a captação e degradação do diesel. Quanto à resistência a antibióticos e toxicidade, é possível utilizar a engenharia genética para tentar minimizar o risco do uso destes organismos no meio ambiente, reduzindo assim os impactos aos organismos vivos. Estudos adicionais deverão ser realizados, tanto com as culturas puras quanto combinadas em consórcio, a fim de validar a eficácia destas cepas na degradação de diesel e redução de toxicidade do meio residual.

O presente estudo funcionou como uma triagem para que a biotecnologia aplicada seja desenvolvida em estudos futuros, para ter plena confiança do uso e aplicação desses organismos nativos na biorremediação. O conhecimento acerca do potencial biotecnológico das espécies microbianas da região Amazônica (com ênfase na cidade de Manaus, local de estudo) é necessário por ser o pontapé inicial para que novas tecnologias na área ambiental sejam desenvolvidas, valorizando assim o uso responsável e sustentável do patrimônio genético amazônico e contribuindo para a evolução científica e tecnológica da região, além de chamar atenção para problemáticas presentes no cotidiano amazonense e apresentando soluções possíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEER, A. B.; AHMED, M.; TAYELB, A.; ELGUINDY, N. M.; SUEF, B. Production of new rhamnolipids Rha C16-C16 by Burkholderia sp. through biodegradation of diesel and biodiesel. University Journal of Basic and Applied Sciences, vol. 7, no. 4, p. 492-498, 2018.

AEBI, C. *Moraxella catarrhalis* – pathogen or comensal? Adv. Exp. Med. Biol., v. 697, p. 107–116, 2011.

AGERSØ, Y.; BJERRE, K.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E.; NIELSEN, B.; SIEZEN, R. Putative antibiotic resistance genes present in extant Bacillus licheniformis and Bacillus paralicheniformis strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. PLoS ONE, vol. 14, no.1, 2019

AGOSTINI JÚNIOR, I. 2016. Contaminantes, atributos físicos e químicos em solo com derrame de derivados de petróleo. 2016. 90p. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina.

ALABURDA, J., NISHIHARA, L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. Revista Saúde Pública, 32(2): 160 - 165, 1998.

ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. New York: John Wiley & Sons, 12 ed., 1994.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A., Thermodynamics of Droplet Clustering in Percolating Water-in-Oil Microemulsions. Journal of Physical Chemistry, v. 99, n. 20, 1995.

ALMATAWAH, Q. An Indigenous Biosurfactant Producing Burkholderia cepacian with High Emulsification Potential towards Crude Oil. Journal of Environmental & Analytical Toxicololgy, v. 7, n. 6, p. 528, 2017.

ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology, v. 3, p:1-9, 2003.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE - API. Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites. [S. l.]:API Publishing Services (API Publication Number 4709), 2001.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. Ecletica Química, vol.35, n.3, 2010.

ANNA, L. M. M. S.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; PEREIRA, N. J; FREIRE, D. M. G. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolada de ambientes de petróleo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, p. 13, 2000.

ARAÚJO, L. V.; GUIMARÃES, D. M.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas Química Nova, vol. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.

ARAÚJO, S. P. 2014, Produção de inóculo microbiano obtido de macrófitas aquáticas na Amazônia com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

ARCANGELI, J-P.; ARVIN, E. Growth of an aerobic and an anoxic toluene-degrading biofilm - a comparative study. Water Science and Technology, v. 32, n. 8, p. 125-132, 1995.

ARRUDA, A. Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) com potencial à paratransgênese para o controle da malária. Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, 2017.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L. G.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Applied and Microbiology Biotechnology, vol. 87, p. 427–444, 2010.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTO, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology, vol. 19, p. 260–265, 2008.

BATISTA, I. H. Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes*

na Amazônia. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

BERGER, T. M. 2005. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005

BERTON, S. M. H. Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromáticos utilizando *Vìbrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo-β-lactamases. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

BERTTI, G. 2018. Caminhão derrama 100 litros de óleo diesel no mar em Ilhabela. http://www.meon.com.br/noticias/regiao/caminhao-derrama-100-litros-de-oleo-diesel-no-mar-em-ilhabela . Acesso em 28/20/18.

BHASHEER, S. K.; UMAVATHI, S.; BANUPRIYA, D.; THANGAVEL, M.; THANGAM, Y. Diversity of diesel degrading bactéria from a hydrocarbon contaminated soil. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., vol. 3, n. 11, p. 363 – 369, 2014.

BHAT, M. A.; TSUDA M.; HORIIKE, K.; NOZAKI, M.; VAIDYANATHAN, C. S.; et al. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, p. 307-312, 1994

BHATTACHARYYA, A.; HALDAR, A.; BHATTACHARYYA, M.; GHOSH, A. Anthropogenic influence shapes the distribution of antibiotic resistant bactéria (ARB) in the sediment of Sundarban estuary in India. Science of the Total Environment, v. 647, p. 1626–1639, 2019.

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

BOTTONE, J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clinical Microbiology

vol. 23, no. 2, p. 382–398, 2010.

BRANDA, S. S.; CHU, F.; KEARNS, D. B.; LOSICK, R.; KOLTER, R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Molecular Microbiology, v. 59, n. 4, p. 1229–1238, 2006.

BRAUN, S. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. Química Nova, vol. 27, n. 3, 472-482, 2003.

BRITO, G. C. B.; SOUZA, D.B.; VASCONCELOS, F. C. W.; BRAGA, L.C. A importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminados com produtos derivados do petróleo. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.3, n.3, p. 291-310, 2010.

BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINMEMAN, K. P. Human Pharmacology: Molecular to Clinical. (3ª ed.) Missouri: Mosby, 1998.

BUENO, S. M. 2008. Bactérias produtoras de biossurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, São Paulo.

BUSH, K. Metallo-β-lactamases: A class apart. Clin. Infec. Dis., v.27, n.1, p.48-S53, 1998.

BUSH, K.; JACOBI, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995

BUSH, K. New β-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin. Infect. Dis., v.32, p.1085-1089, 2001.

CALVO, C., MANZANERA, M., SILVA-CASTRO, G. A., UAD, I., AND GONZALEZ- LOPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremedia- tion processes. Future prospects. Sci. Total Environ., v. 407, p. 3634–3640, 2009.

CARAHER, E.; REYNOLDS, G.; MURPHY, P.; McCLEAN, S.; CALLAGHAN, M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 26, p. 213–216, 2006.

CARDENES, G. O. 2017. Avaliação do potencial de *Acinetobacter junii* sb132 na degradação de hidrocarbonetos do diesel. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CARVALHO, M. 2003. Mapeamento da Sensibilidade Ambiental ao Impacto por óleo de um Segmento da Costa entre os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará Utilizando Imagens ETM+/LANDSAT7 e Geoprocessamento. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Espaciais – INPE. 253 p.

CATTER, K. M.; OLIVEIRA, D. F.; SOUSA, O. V.; GONÇALVES, L. R. B.; VIEIRA, R. H. S. R.; ALVES, C. R. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia gladioli* isolated from mangrove sediments using alternative substrates. Orbital: the electronic journal of chemistry, vol.8, no. 5, 2016

CETESB, 2018. Xileno. Ficha de informação toxicológica. https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wpcontent/uploads/sites/24/2013/11/Xileno.pdf. Acesso em 03/12/2019.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces. Colloids Surf B Biointerfaces, v. 78, n. 1, p. 101-8, 2010.

CHANG, W. C.; HSU, G. S.; CHIANG, S. M.; SU, M. C. Heavy metal removal from aqueous solution by wasted biomass from a combined AS-biofilm process. Bioresource Technology, v. 97, n. 13, p. 1503 – 1508, 2006.

CHAVES, N. S. T.; LIMA, A. M. V.; AMARAL, A. V. C. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa em ovinos causada por *Moraxella* spp. no estado de Goiás, Brasil. Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 1, p. 256-261, 2008.

CHEN, W.; QU, Y.; XU, Z.; HE, F.; CHEN, Z.; HUANG, S.; LI, Y., Heavy Metal (Cu, Cd, Pb, Cr) Washing from River Sediment using Biosurfactant Rhamnolipid. Environmental Science and Pollution Research International, v. 24, n. 19, p.16344-16350, 2017.

CHIKERE; C. B.; CHIKERE; B. O.; OMONI, V. T. Antibiogram of clinical isolates from a hospital in Nigeria. African Journal of Biotechnology, vol. 7, no. 24, p. 4359-4363, 2008

.CLARK, P.J.; WARD, T.J. The response of sourthern hemispheres altmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 175, p.43 - 57, 1994.

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

COLLA, T. S. Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio microbiano. Orientadora: Fátima Menezes Bento. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G. Mercaptans emissions in diesel and biodiesel exhaust. Atmospheric Environment, v. 42, n. 28, p. 6721 – 6725, 2008.

COSTA FILHO, G. F. 2011. Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de Origem Vegetal Estimulada por Biossurfactantes em Meio Aquoso e Monitoramento de sua Toxicidade. TCC (Graduação) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova, vol. 31, no. 7, p.1820-1830, 2008

COSTA, S.G.V.A.O.; DÉZIEL, E.; LÉPINE, F. Characterization of rhamnolipid production by Burkholderia glumae. Letters in Applied Microbiology, 2011.

CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. Bioremediation: principles and applications. Great Britain: Cambridge University Press, 1996.

CRAIG, A. P. L.; MAGALHÃES, L.; KRAUSE, M. C.; NEVES, P. R.; SILVA, M. J. Técnicas de limpeza de vazamentos de petróleo em alto mar. Cadernos de graduação – ciências exatas e tecnológicas, v. 1, n. 15, p. 75 – 86, 2012.

CRAPEZ, M.A.C; BORGES, A.L.N; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, Ciência Hoje, Vol 30, N 179, 2002. CRAPEZ, M.A.C; BORGES, A.L.N; BISPO, M.G.S.; PEREIRA, D.C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo, Ciência Hoje, Vol 30, N 179, 2002.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecologi- cal niches. Environ. Microbiol., v. 5, p. 719–729, 2003.

CUSTANCE, S.R.; MCCAW, P.A.; KOPF, A.C. &SULLIVAN, M.J. Environmental fate of the chemical mixtures: crude oil, jp-5, mineral spirits, and diesel fuel. J. Soil Contam., v.1, p. 379-386, 1992.

DEAN-ROSS, D.; MOODY, J.; CERNIGLIA, C. E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. FEMS Microbiol. Ecol., v. 41, n. 1, p. 1-7, 2002.

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

DIELS, L., SPAANS, P. H.; VAN ROY, S.; HOOYBERGHS, L. Heavy metal removal by sand filters inoculated with metal sorbing and precipitating bacteria. Hydrometallurgy, v. 71, p. 235–241, 2003

DOYLE, R. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Microbiology Infection, vol. 2, p. 391–400, 2000.

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

EHLING-SCHULZ, M.; BAĞCIOĞLU, M.; FRICKER, M.; JOHLER, S. Detection and Identification of *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus, Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus weihenstephanensis* via Machine Learning Based FTIR Spectroscopy. Frontiers in Microbiology, v. 10, n. 902, 2019.

ELY, V. L. 2018. *Moraxella bovis, Moraxella ovis e Moraxella bovoculi*: Formação de biofilme e atividade da lisozima. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ERNESTO, M. F S., Poluição por petróleo nos ambientes marinho e costeiro. Universidade Norte do Paraná. 2010.

EUSTON, S. R., Molecular Simulation of Biosurfactants with Relevance to Food Systems. Current Opinion in Colloid & Interface Science, v. 28, p. 110-119, 2017.

FARIA, A. F. 2010. Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

FERGUSON, A. S., HUANG, W. E., LAWSON, K. A., DOHERTY, R., GIBERT, O., DICKSON, K. W., WHITELEY, A. S., KULAKOV, L. A., THOMPSON, I. P.,KALIN, R. M., LARKIN, M. J. Microbial analysis of soil and groundwater from agas works site and comparison with a sequenced biological reactive barrier remediation process. Journal of Applied Microbiology, v. 102, p. 1227-1238, 2007.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUDA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. Int. Biodeter. Biodegr., vol. 65, p. 182–1188, 2011

FERREIRA, M.F.; BEAUMORD, A.C. Mapeamento da sensibilidade ambiental à derrames de óleo nos cursos de água da bacia do rio Canhanduba, Itajaí, SC. Braz. J. Aquat. Sci. Technol., v. 12, n.2, p. 61 – 72, 2008.

FERREIRA, S. L; SANTOS, A. M.; SOUZA, G. R. Análise por cromatografia gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). Quim. Nova, vol. 31, n. 3, 539-545, 2008.

FERREIRA, T. C.; SILVA, D. P.; BETTIOL, W. Resistência de diferentes cepas de *Bacillus* spp. a antibióticos. Summa Phytopathologica, vol. 43, 2017

FLAMM, R. K.; SADER, H. S.; FARREL, D. J.; JONES, R. N. Macrolide and tetracycline resistance among *Moraxella catarrhalis* isolates from 2009 to 2011. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 74, n. 2, p. 198-200, 2012.

FLANNAGAN, R. S.; LINN, T.; VALVANO, M. A. A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus *Burkholderia.* Environmental Microbiology, v. 10, n. 6, p. 1652–1660, 2008.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. Nature Reviews: Microbiology, v. 8, n.9., p. 623 – 633, 2010.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, A.; BANAT, I. M. Applications of Biological Surface Active Compounds in Remediation Technologies. Biosurfactants, cap. 9, p. 121-134, 2010.

FURLAN, B. 2011. Biodegradação de naftaleno, fenantreno e diesel por isolados de gênero *Burkholderia* da Amazônia. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.

G1 SC, 2017. Há 20 dias, operação tenta limpar solo atingido por vazamento de petróleo em Itapoá. https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/ha-20-dias-operacao-tenta-limpar-solo-atingido-por-vazamento-de-petroleo-em-itapoa.ghtml . Acesso em: 28/10/18..

GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos de biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, n. 34, 2005.

GHAZALI, F. M. et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Internacional Biodeterioration & Biodegradation, v. 54, p. 61-67, 2004.

GODHEJA, J.; DIXIT, K.; SHARMA, P. Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in different sites. Rec. Res. in Science and Technology, v.6, no. 1, p. 263-267, 2014.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial Activity of a Biosurfactant Produced by Bacillus *licheniformis* Strain M104 Grown on Whey. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 56, n. 2, p. 259 – 268, 2013.

GREENPEACE, 2011. O tamanho do estrago http://www.greenpeace.org/brasil/pt/Noticias/Petroleo-nada-transparente/. Acesso em 28/10/18.

GRIFOLL, M.; SELIFONOV, S. A.; GATLIN, C. V.; CHAPMAN, P. J. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 3711-3723, 1995.

GONZÁLEZ, M. G. B.; MOLINA C. E.; PEINADO F. M.; RUANO S. M. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal (loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site." Journal of soils and sediments. v. 11, n. 2, p. 281-289, 2011.

GUARIEIRO, L. L. N.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C. Poluentes Atmosféricos Provenientes da Queima de Combustíveis Fósseis e Biocombustíveis: Uma Breve Revisão. Rev. Virtual Quim., 2011, v.3, n. 5, 434-445

GUROUT-FLEURY, A.; SHAZAND; K.; FRANDSEN, N.; STRAGIER, P. Antibiotic-resistance cassettes for Bacillus subtilis (Erythromyc; kanamycin; tetracycline; spectinomycin; chromosomal disruption). Gene, vol. 167, p. 335 - 336, 1993.

HADPANUS, P.; PERMSIRIVISARN, P.; ROYTRAKUL, S.; TUNGPRADABKUL, S. Biomarker discovery in the biofilm-forming process of *Burkholderia pseudomallei* by mass-spectrometry. Journal of Microbiological Methods, v. 159, p. 26–33, 2019.

HARE, K. M.; SEIB, K. L.; CHANG, A. B.; HARRIS, T.; SPARGO, J. C.; SMITH-VAUGHAN, H. C. Antimicrobial susceptibility and impact of macrolide antibiotics on *Moraxella catarrhalis* in the upper and lower airways of children with chronic endobronchial suppuration. Journal of Medical Microbiology, v. 68, n. 8, p. 1140-1147, 2019.

HARVEY, S; ELASHVILLI, I.; VADES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, M. 1990. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. Biotechnology, 8: 228 - 230.

HATFIEL, J. L.; STEWART, B. A. Soil Biology: Effects on Soil Quality, 1994.

HAYES, M.O; HOFF, R.; MICHEL, J.; SCHOLZ, D.; SHIGENAKA, G. An introdution to coastal habitats and biological resources for oil spill response, 1992.

HUSSAIN, M.; CARLINO, A.; MADONNA, M.J.; LAMPEN, J.O. Cloning and sequencing of the metallothioprotein β-lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v.164, n.1, p.223- 229, 1985.

ITOPF. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited – Oil tanker spill statistics: 2009. p. 1 - 8, 2009. Disponível em: http://www.itopf.com. Acesso em: 28/10/2018.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência e Natura, v. 29, n.1, p. 7-24, 2007.

JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. Advances in Colloid and Interface Science, 2019

JAIN, D. K., COLLINS-THOMPSON, D. L., LEE, H.A drop collapsing test for screening biosurfactant producing microorganisms. J. Microbiol. Meth, v. 13, p. 271–279, 1991.

JAYSREE, R. C.; BASU, S.; SINGH, P. P.; GHOSAL, T.; PATRA, P. A.; KEERTHI, Y.; RAJENDRAN, N. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. Pharmacology Online, v. 3, p. 1427-1433, 2011.

JORNAL DA CATVE. 2014. Limpeza do solo e água contaminado sem derramamento de óleo continua. https://catve.com/noticia/6/79481/limpeza-do-solo-e-agua-contaminados-em-derramamento-de-oleo-continuam. Acesso em: 28/10/2018.

JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Degradation of benzo(a)pyrene, dibenz (a, h)anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia*. Water Science Technology, vol. 36, p. 45-51, 1997.

KACZOREK, E.; CHRZANOWSKI, £.; PIJANOWSKA, A.; AND OLSZANOWSKI, A. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipids and saponins. Biores. Technol., v. 99, p. 4285–4291, 2008.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol., v. 182, n. 8, p. 2059 - 2067, 2002.

KAZUNGA, C.; AITKEN, M. D. Products from the incomplete metabolism of

pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, p. 1917-1922, 2000.

KEBRIA, Y; KHODADADI, A.; GANJIDOUST, H., BADKOUBI, A.; AMOOZEGAR, A. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus* strain capable of degrading diesel fuel. International Journal of Environmental Science & Technology, v. 6, n. 3, p. 435–442, 2009.

KRASOWSKA, A.; SIGLER, K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, vol. 4, no. 112, 2014

KUMAR, A. S., MODY, K. E JHA, B. Evaluation of Biosurfactant/Bioemulsifier Production by a Marine Bacterium. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 79, p. 617-621, 2007

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E.P. Some properties of two extracellular β-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. Biochem. J., v.103, p.27c - 30c, 1967.

LABORCLIN. Manual para Antibiograma (difusão em disco – Kirby & Bauer). Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, rev. 05. Disponível em https://www.laborclin.com.br/documentos/?search_vagas=antibiograma&submit=Enviar. Acesso em: janeiro/2018

LANG, S. Biological Amphiphiles: Microbial Surfactants. Opinion in Colloid and Interface Science, vol. 7, p. 12-30, 2002.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 97, p. 2327–2339, 2013

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

LEAÑOS-MIRANDA, B.; MIRANDA-NOVALES, M. G.; SOLÓRZANO-SANTOS, F.; ORTIZ-OCAMPO, L.; GUISCAFRÉ-GALLARDO, H. Prevalencia de colonización por Moraxella catarrhalis en portadores asintomáticos menores de seis años. Salud Pública de México, vol. 43, no.1, 2001.

LEITÃO, J. H.; SOUSA, S. A.; FERREIRA, A. S.; RAMOS, C. G.; SILVA, I. N.; MOREIRA, L. M. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against Burkholderia cepacia complex pathogens and related species. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 87, p. 31–40, 2010

LELES, D. Avaliação ecotoxicológica de efluente têxtil com corante utilizando sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

LIMA, A. S. B.; SIMÃO, C. J. B.; SOUSA SILVA, F. J.; RODRIGUES, J. R. F.; ARAÚJO, T. C. A Biorremediação como técnica de tratamento de efluentes contaminados por petróleo. 5º Encontro Regional de Química & Blucher Chemistry Proceedings, vol. 3, n. 1, 2015.

LIMA, D. C. R. 2010. Microrganismos degradadores de petróleo isolados de solos rizosfericos da província petrolífera de Urucu, Coari. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

LIMA, D. V. 2012 Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do estado de São Paulo, Brasil. Tese (doutorado0 – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOPES, C. F.; MILANELLI, J.C.C.; POFFO, I.R.F. Ambientes costeiros contaminados por óleo: procedimentos de limpeza – manual de orientação. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007.

LOPES, E. F. 2019. Caracaterização genômica e da capacidade de degradar componentes de petróleo de uma linhagem de *Burkholderia gladioli* isolada do Lago de Coari (Coari-Amazonas). Tese (doutotado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterisation of surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by Candida sphaerica UCP0995 for application in the petroleum industry. Colloids Surf B, vol. 102, p. 202–209

MACENA, I. R. 1997. Estudos sobre o metabolismo de *Bacillus cereus* isolados de alimentos adquiridos no Mercado varejista da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Monografia – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MALLMANN, V.; ARAGÃO, L. W. R.; FERNANDES, S. S. L.; FERNANDES, T. C. L.; ARAGÃO, R. F. R.; SILVA, R. C. L. As vantagens da biorremediação na qualidade ambiental. Ensaios e Cienc., v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MANDRI, T., LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu - Natal, South Africa. African Journal of Biotechnology, v. 6, n. 1, p. 023-027, 2007.

MAPRIC. Boletim técnico: Tween 20, São Paulo, 2007.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology, vol. 30, no. 11, 2012

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 56, p. 650–663, 2001.

MATOS, G. C. G. Amazonas: a marca da água e o uso dos rios. XII Simpósio Internacional Processo Civilizador, Recife, 2009.

MARIANO, A. P. 2006. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MARTINS. B. A. D. 2005. Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

MELO, I. S; AZEVEDO, J.L de Eds. Microbiologia ambiental: Jaguaruína: Embrapa CNPMA, p.440, 1997.

MELO, T. B. 2018. Ecotoxicidade de efluente sintético contendo alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) proveniente do tratamento por eletrocoagulação. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

MEYER, D. D. 2011. Avaliação da biodegrabilidade em misturas de diesel e biodiesel (B0, B10 E B100) em dois solos com diferentes granulometrias. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MICHEL, J. 2002. Adverse effects from oil. Disponível em http://www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf . Acesso em 28/10/18.

MILANELLI, J. C. C. 1994. Efeitos do Petróleo e da Limpeza por Jateamento em um Costão Rochoso da Praia de Barequeçaba, São Sebastião, SP. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 103 p.

MIRANDA, L. S.; ANJOS, J. A. S. A.; MOREIRA, I. T. A. Avaliação de tecnologias de remediação em zonas costeiras impactadas pela indústria de petróleo. Revista Eletronica de Energia, v. 4, n. 1, p. 19 – 37, 2014.

MOHANTY G.; MUKHERJI, S. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures. International Biodeterioration & Biodegradation, 61: 240–250, 2008.

MOHAMMED, A. B. A.; TAYEL, A. A.; ELGUINDY, N. M. Production of new rhamnolipids Rha C16-C16 by *Burkholderia* sp. through biodegradation of diesel and biodiesel. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, v. 7, n. 4, p. 492-498, 2018.

MONTAGNOLLI, R.N.; LOPES, P.R.; BIDOIA, E.D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. Environ. Monit. Assess., v. 187, 1 – 17, 2015

MORAES, F. M. 2014. Estudo da patogenicidade de isolados de *Burkholderia* sp e Stenotrophomonas maltophillia em amostras clínicas. Dissertação (mestrado) - Universidade CEUMA, São Luis.

MORAIS FILHO, M. C.; CORIOLANO, A. C. F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. HOLOS, Ano 32, vol. 7, 2016.

MORO, G. V. 2018. Obtenção e caracterização de biosurfactantes produzidos por microrganismos isolados de ambientes contaminados com petróleo para usos biotecnológicos. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MUTECA, F. L. L. 2012. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru

proveniente de Angola. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. Environm. Sci. Poll. Res., v. 18, p. 471 – 478, 2011

NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—eighth edition. Nccls document m2-a8 (isbn 1-56238-485-6). NCCLS, 940 west valley road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. 2003.

NEGRÃO, P. Investir para depois Remediar. Revista Limpeza Pública, n. 66, p. 20 – 26, 2007.

NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiology Reviews, vol. 60, p. 151–166, 1996

NOBRE, M.M.; NOBRE, R.C.M. Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. In Química e Derivados vol.31, 2008. Disponível em http://www.quimica.com.br/revista/qd417/solo1.htm

NORMAS BRASIL. Instrução Normativa IBAMA nº 5 de 17/05/2010. Disponível em:https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-5-2010_77809.html. Acesso em: janeiro/2018

OBUEKWE, C. O.; AL-JADI, Z. K.; AL-SALEH, E. Insight into heterogeneity in cell-surface hydrophobicity and ability to degrade hydrocarbons among cells of two hydrocarbon-degrading bacterial populations. Can J Microbiol, v. 53, p. 252–260, 2007.

OBUEKWE, C.O.; AL-JADI Z. K.; AL-SALEH, E. Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl. Microbiol 105:1876–1887, 2008.

OOSTHUIZEN, M. C.; STEYN, B.; LINDSAY, D.; BRÖZEL, V. S.; HOLY, A. V. Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. FEMS Microbiology Letters, v.194, p. 47-51, 2001.

OOSTHUIZEN, M. C.; STEYN, B.; THERON, J.; COSETTE, P.; LINDSAY, D.; HOLY, A. V.; BRÖZEL, V. S. Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation. Applied And Environmental Microbiology, v. 68, n. 6, p. 2770–278, 2002.

ORTIZ, A.; TERUELA, A. J.; ESPUNYB, J. M.; MARQUÉS, A.; MANRESAB, A. E.; ARANDA, J. F. Interactions of a Bacterial Biosurfactant Trehalose Lipid with Phosphatidylserine Membranes. Chemistry and Physics of Lipids, v. 158, p. 46 - 53, 2009

ORTIZ, F. 2014. Baía de Guanabara: vazamento da Petrobras completa 14 anos.http://www.oeco.org.br/reportagens/28021-baia-de-guanabara-vazamento-dapetrobras - completa-14-anos. Acesso em 28/08/18.

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

PADMAVATHY, S.; ASHA DEVI, N. K.; M. ALAGAR, M.; BABU, R. D. Characterization and antibiogram pattern of marine bacteria against multi drug resistant pathogens. Current Science Perspectives, v.1, n. 2, p. 62- 68, 2015

PALADINO, E. E.; Modelagem matemática e simulação numérica de trajetórias de derrames de petróleo no mar. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

PARVATIYAR, M. G.; GOVIND, R.; BISHOP, D. F. Biodegradation of toluene in a membrane biofilter. J. Membr. Sci., v. 119, p. 17–24, 1996.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Production and roles of biosurfactant and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids and Derived Compounds, p. 1502–1512, 2009

PENA, P. G. L.; NORTHCROSS, A. L.; LIMA, M. A. G.; RÊGO, R. C. F. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. Cadernos de Saúde Pública, v. 36, n. 2, p. 2 – 5, 2020.

PETROBRÁS. Óleo Diesel - Informações Técnicas, versão 1.3, 2018. Disponível em: http://sites.petrobras.com.br/minisite/assistenciatecnica/public/downloads/diesel-manual.pdf . Acesso em: 17/ 01/ 19.

POIMENIDOU, S. V., CHRYSADAKOU, M., TZAKONIATI, A., BIKOULI, V. C., NYCHAS, G.-J., & SKANDAMIS, P. N. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. International Journal of Food Microbiology, 237, 164–171, 2016.

PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. Critical Reviews in Microbiology, Philadelphia, vol. 19, p. 217-242, 1993.RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT1, R.; BANAT, I. M. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. Acta Biotechnologica, v. 23, n. 24, p. 335–345, 2003

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology, v. 85, n. 3, p. 257-261, 2002

REVATHY, T.; JAYASRI, M. A.; SUTHINDHIRAN, K. Biodegradation of PAHs by Burkholderia sp. VITRSB1 isolated from marine sediments. Scientifica, 2015

RODGERS, K.; MCLELLAN, I.; PESHKUR, T.; WILLIAMS, R.; TONNER, R.; S. HURSTHOUSE, A. S.; KNAPP, C. W.; HENRIQUEZ, F. L. Can the legacy of industrial pollution infuence antimicrobial resistance in estuarine sediments? Environmental Chemistry Letters, v.17, p. 595–607, 2019

ROCHA, C. R. M.; SILVA, V. N.; CICERO, S. M. Avaliação do vigor de sementes de girassol por meio de análise de imagens de plântulas. Ciência Rural, v. 45, n. 6, p. 970-976, 2015

ROCHE. R. Vamos entender o que é remediação e seus métodos? Artigo Técnico, 2008. Disponível em < http://www.robertoroche.com.br/artigos.php?id_artigo=24>.

ROSAS, P. 2018. Embarcação afunda e derrama óleo no Rio Negro; é o 2º caso em oito dias. https://www.acritica.com/channels/manaus/news/embarcacao-

afunda-e-oleo-e-derramado-no-rio-negro-e-o-2-caso-em-oito-dias. Acesso em 28/10/18.

ROSENBERG, E. Microbial biosurfactants. Crit. Rev. Biotechnol., v. 3, p. 109 – 132, 1986.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioremediation of petroleum contamination. In CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. Bioremediation: principles and applications. Great Britain: Cambridge University Press, 1996.

ROSENBERG, M. et al. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microb. Letts., v. 9, p. 29 – 33, 1980.

SABATH, L.D.; ABRAHAM, E.P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. Biochem. J., v.98, n. p.11c-13c, 1966.

SAITO, R.; MATSUOKA, S.; FUJINAMI, Y.; NONAKA, S.; ICHINOSE, S.; KUBOTA, T.; OKAMURA, N. Role of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD in bacterial cell morphology and autoaggregation. Research in Microbiology, v. 164, p. 236-243, 2013

SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Biotechnology, vol.20, n.6, 2002.

SANTHINI, K.; MYLA, J.; SAJANI, S.; USHARANI, G. Screening of *Micrococcus* sp. From Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation. Botany Research International, v. 2, n. 4, p. 248-252, 2009.

SANTOS, J. F. Proteínas de *Bacillus pumilus* envolvidas na degradação de petróleo e diesel. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SANTOS. E.; UNGARI, H. C. N.; SANTOS; M. B. SANTOS, E.; CESAR, H.; UNGARI, N.; BARGA, M.; SANTOS, D. O. S. (2008). Principais técnicas de remediação e gerenciamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos no estado de São Paulo. Monografia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SARKAR, P.; ROY, A.; PAL, S.; MOHAPATRA, B.; KAZY, S. K.; MAITI, M. K.; SAR, P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation, Bioresource Technology, 2017

SARUBBO, L. A.; DE LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BRASILEIRO, P. P. F., Production of a Low- Cost Biosurfactant for Application in the Remediation of Sea Water Contaminated with Petroleum Derivates. In 5th International Symposium on Industrial Biotechnology, Bardone, E.; Bravi, M.; Keshavarz, T., Eds. v. 49, p 523-528, 2016.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods of investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. Crit. Rev. Biotechnol., v. 30, p.127–144, 2010

SEKHON - RANDHAWA, K. K. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities. Biosurfactants, p. 49–67, 2014

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.

SFACIOTTE, R. A. P. 2014. Perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em patógenos bacterianos em animais de companhia. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Palotina.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública. Maringá. v. 1, n. 1 p. 29-38, 2014.

SHARMA, A.; REHMAN, M. B. Laboratory scale bioremediation of diesel hydrocarbon in soil by indigenous bacterial consortium. Indian Journal of Experimental Biology, v. 47, p. 766 – 769, 2009.

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

SILVA, D. S. P. Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Quim. Nova, vol. 29, no. 4, 844 - 855, 2006.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENZI, T. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. TRENDS in Microbiology, v. 14, n. 9. P. 398 – 397, 2006.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, p. 3706–3723, 2010

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, p. 3689–3704, 2010

SONG, Z.; ZHAO, Q.; ZHU, L.; ZHANG, Z.;, JIANG, L.; HUANG, H. E.; ZHE, S.; QIANRU, Z.; LIYING, Z.; ZHIDONG, Z.; LING, J.; HE, H. Draft genome sequence of a multidrug-resistant β-lactamase–harboring Bacillus cereus S66 isolated from China. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019

SOUZA NETO, J. N. 2015. Perfil proteômico de *Acinetobacter junii* SB132 cultivada em petróleo e diesel. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

SPEIGHT, J. G. The Chemistry and Technology of Petroleum. 4 ed., p. 955, Boca Raton, CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006.

SZEWCZYK, S. B. O. Processos envolvidos em um derramamento de óleo no mar. FURG. 2006.

TAVARES, S. R. L. Técnicas de remediação. Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados: conceitos básicos e fundamentos. Clube de Autores, v. 2, p. 61 – 90, 2013.

TECNOHIDRO PROJETOS AMBIENTAIS. Consulta geral a homepage. 2008. Disponível em < http://www.tecnohidro.com.br/tecnologias.htm > Acesso em 15/06/2018

TEIXEIRA, L.; MELQUIOR, V. L. The Family Moraxellaceae. The Prokaryotes, p. 443 – 476, 2014.

THAVASI, R; NAMBARU, V. R. M. S.; JAYALAKSMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; Bana, I. M. Biosurfactant Production by Pseudomonas aeruginosa from Renewable Resources. Indian J Microbiol, v. 51, n. 1, p. 30 – 36, 2011.

THOMAS, J. E. Fundamentos da Engenharia de Petróleo. Rio de Janeiro, Interciência, 2001.

TOMAZELLI, K. G.; WERLANG, F.; SANTANA, L. M.; DEHON, M.; BENDATI, M. M. A.; VAN DER SAND, S. T.; CORÇÃO, G. Suscetibilidade a antibióticos em bactérias isoladas de amostras dos balneários do rio Guaíba. Salão de Iniciação Científica. Livro de resumos, Porto Alegre: UFRGS, 1997.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação de Biorremediação de Compostos do Petróleo por Bactérias: Revisão. Oecologia Australis, v. 14, n. 4, p. 1025 - 1035, 2010.

TRAVIESO, L.; PELLÓN, A.; BENÍTEZ, L.; HERNANDEZ, H. BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. Biochem. Eng. J., v. 12, n. 2, p. 87–91, 2002.

TURNBULL, P. C.; JØRGENSEN, K.; KRAMER, J. M. Severe clinical conditions associated with Bacillus cereus and the apparent involvement of exotoxins. J Clin Pathol, v. 32, n. 3, p. 289-293, 1979

UZOIGWE C.; GRANT BURGESS; J.; ENNIS, C.J.; RAHMAN, P.K.S.M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 245, 2015.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol. Molecul. Bio. Rev., v. 67, n.4, p. 1092-2172, 2003.

VELRAEDS, M. C.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released from *Lactobacillus* strains. Colloids Surf. B Biointerfaces, v. 8, n. 51-61, 1996

VIDALLI, M. Bioremediation: an overview. Pure Applied Chemistry, v. 73, p. 1163–1172, 2001.

VIDAKOVICS, M. L. P.; RIESBECK, K. Virulence mechanisms of *Moraxella* in the pathogenesis of infection. Current Opinion in Infeccious Diseases, v. 22, n. 3, p. 279 – 285, 2009.

VIEIRA, P. A.; VIEIRA, R. B.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. Journal of Hazardous Materials, v. 140, n. 1 - 2, p. 52 - 59, 2007.

VIÑAS, A. M. Aspectos Microbiológicos do complexo *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística. Tese (doutorado) – Universidade Autônoma de Barcelona, Barcelona, 2015

WANG, C.; HE, S.; ZOU, Y.; LIU, J.; ZHAO, R.; YIN, X.; ZHANG, H.; LI, Y. Quantitative evaluation of in-situ bioremediation of compound pollution of oil and heavy metal in sediments from the Bohai Sea, China. Marine Pollution Boletin, v. 150, 2020.

WATTANAPHON, H. T.; KERDSIN, A.; THAMMACHAROEN, C.; SANGVANICH, P.; VANGNAI, A. S. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. Journal of Applied Microbiology, v. 105, p. 416–423, 2008

WIDDEL, F., RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology, v. 12, p. 259-276, 2001.

WIJMAN, J. G. E.; LEEUW, P. P. L. A.; MOEZELAAR, R.; ZWIETERING, M. H.; ABEE, T. Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation, and Dispersion. Applied And Environmental Microbiology, v. 73, n. 5, p. 1481–1488, 2007.

YENDER, R., MICHEL, J.M., LORD, C. Managing Seafood Safety after an Oil Spill. US Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric

Administration, National Ocean Service, Office of Response and Restoration, 2002.

ZHENG, C.; LI, Z.; SU, J.; ZHANG, R.; LIU, C.; ZHAO, M. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. Journal of Applied Microbiology, v. 113, p. 44–51, 2012.

ZHONG, H.; YANG, X.; TAN, F.; BRUSSEAU, M. L.; YANG, L.; LIU, Z.; ZENG, G.; YUAN, X., Aggregate-Based Sub-CMC Solubilization of N-Alkanes by Monorhamnolipid Biosurfactant. New Journal of Chemistry, v. 40, n. 3, p. 2028-2035, 2016.

ZHOU, P.; CHEN, Y.; QIN, H.; OU, H.; HE, B.; YE, J. Cellular metabolismo network of *Bacillus thuringiensis* related to erythromycin stress and degradation. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 160, p. 328 – 341, 2018