

EDMO MONTES RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
PETRÓLEO E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS  
ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIÇÃO PARA A  
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
NA ILHA DA TRINDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696p  
2014

Rodrigues, Edmo Montes, 1989-

Prospecção de bactérias degradadoras de petróleo e  
avaliação de potenciais estratégias de biorremediação para a  
degradação de hidrocarbonetos na Ilha da Trindade / Edmo  
Montes Rodrigues. – Viçosa, MG, 2014.  
x, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Ambientes Naturais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 665.5

EDMO MONTES RODRIGUES

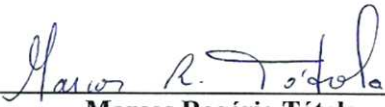
**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE  
PETRÓLEO E AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS  
ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO PARA A  
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
NA ILHA DA TRINDADE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2014.

  
Cynthia Canêdo da Silva

  
Dionéia Evangelista Cesar

  
Marcos Rogério Tótola  
(Orientador)

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

**Johann Goethe**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter permitido chegar até aqui e sempre me acompanhar.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, por todo o conhecimento transmitido, pelo incentivo, apoio e suporte na realização do meu trabalho e principalmente pela confiança em mim depositada.

Aos professores e servidores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão do meu trabalho.

Às minhas ex-orientadoras Dionéia Evangelista Cesar e Cíntia Marques Coelho, que foram meu ponto de referência para iniciar a fazer ciência.

Aos amigos e colegas de trabalho Livia, Daniel, Péricles, Karlos, Victor, Cássia, Tércia, Taídes, Carol, Mari, Pri, Felipe, Déborah, Fernanda e Conrado por estarem presentes e me ajudando a crescer a cada conversa e experimento realizado.

À todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente com o PROTINDADE, especialmente ao Capitão-de-Fragata Rodrigo Otoch Chaves.

Aos amigos Juan, Ide, Tati, Débora, Jana, Elisa e Gabriel que durante um mês me ajudaram com o trabalho de campo e compartilharam alguns dos melhores momentos de minha vida no isolamento da Ilha da Trindade.

Aos meus pais Caio e Sônia e meu irmão Élder, que mesmo um pouco longe, sempre foram meu porto seguro.

Aos meus familiares, por todo o apoio e pensamentos positivos que me fizeram sempre seguir em frente.

Aos meus eternos amigos, Tatiana, Geraldo, Anderson, Layon, William, Livia, Felipe, Carla, Izabela, Neima, Bruna, Ju e Raíza. Alguns mesmo que distantes, me proporcionam um sorriso no rosto toda vez que no encontramos. E claro, pela torcida para que eu encontrasse “a bactéria” que “come” petróleo e por saber que os tenho quando precisar.

## **BIOGRAFIA**

EDMO MONTES RODRIGUES, filho de José do Carmo Rodrigues e Sônia Maria Montes Rodrigues, nasceu em Leopoldina, Minas Gerais, no dia 14 de maio de 1989.

Em agosto de 2011, diplomou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora e em dezembro do mesmo ano, diplomou-se em Bacharelado em Ciências Biológicas também pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em Março de 2012 iniciou o programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1 PETRÓLEO: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES.....	3
1.1.1 Composição Físico-Química.....	4
1.1.2 Exploração e Produção de Petróleo no Brasil.....	5
1.1.3 Contaminação de Ambientes Marinhos por Petróleo.....	6
1.2 BIODEGRADABILIDADE E TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS.....	8
1.2.1 Biodegradação.....	9
1.2.2 Efeitos Tóxicos dos Hidrocarbonetos de Petróleo.....	11
1.2.3 Impactos dos Hidrocarbonetos na Biota.....	13
1.3 ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO AMBIENTAL DE PETRÓLEO EM AMBIENTES MARINHOS.....	14
1.3.1 Remediação Física e Química.....	14
1.3.2 Biorremediação.....	18
1.3.2.1 Atenuação Natural.....	18
1.3.2.2 Bioaugmentação.....	19
1.3.2.3 Bioestimulação.....	22
1.4 REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2: PROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS DA ILHA DA TRINDADE COM POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO.....	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.2.1 Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras.....	37
2.2.2 Enriquecimento e Isolamento de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos.....	38
2.2.3 Extração de DNA.....	38
2.2.4 Determinação da Sequência Parcial do Gene 16S rRNA e Análises Filogenéticas por MIDI.....	38
2.2.5 Análise da Presença de Genes de Vias do Catabolismo de Hidrocarbonetos.....	39
2.2.6 Detecção da Produção de Biossurfactantes.....	40
2.2.7 Ensaio de Crescimento em Meios de Cultivo com Hidrocarbonetos.....	41
2.3 RESULTADOS.....	41
2.3.1 Isolamento e Identificação Taxonômica.....	41

2.3.2 Presença de Genes de Vias de Degradação de Hidrocarbonetos.....	43
2.3.3 Produção de Biossurfactantes.....	44
2.3.4 Ensaio de Crescimento com Hidrocarbonetos.....	44
2.4 DISCUSSÃO.....	45
2.5. REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO 3: DIVERSIDADE MICROBIANA E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR MICRORGANISMOS NAS ADJACÊNCIAS DA ILHA DA TRINDADE – BRASIL.....	
3.1 INTRODUÇÃO.....	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.2.1 Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras.....	57
3.2.2 Ensaio de Colonização <i>ex situ</i> .....	58
3.2.3 Extração de DNA.....	58
3.2.4 PCR – T-RFLP <i>multiplex</i> .....	59
3.2.5 Análises de T-RFLP.....	60
3.2.6 Produção, Purificação e Quantificação de Biossurfactante.....	60
3.2.7 Produção do Inóculo.....	61
3.2.8 Biorremediação.....	62
3.2.9 Análises Estatísticas.....	62
3.3 RESULTADOS.....	63
3.3.1 Análise da Estrutura da Comunidade Microbiana.....	63
3.3.2 Análises de Agrupamento.....	66
3.3.3 Avaliação do Potencial para Biorremediação na Região Litorânea da Ilha da Trindade.....	70
3.4 DISCUSSÃO.....	72
3.5 REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÕES.....	77

## RESUMO

RODRIGUES, Edmo Montes. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2014. **Prospecção de bactérias degradadoras de petróleo e avaliação de potenciais estratégias de biorremediação para a degradação de hidrocarbonetos na Ilha da Trindade.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Maurício Dutra Costa, Poliane Alfenas Zerbini e Wendel Batista da Silveira.

Este estudo teve como objetivos prospectar bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia, analisar a estrutura e dinâmica da comunidade microbiana que coloniza o petróleo após sua exposição no mar utilizando dados de T-RFLP *multiplex*, assim como simular e analisar a eficiência de diferentes estratégias de biorremediação de petróleo no litoral da Ilha da Trindade – Brasil. Para tanto, foi montado um experimento à aproximadamente 100 m da praia das Tartatugas na Ilha da Trindade, onde uma haste de alumínio de 1,5 m de comprimento, contendo 20 cupons de acrílico (4 cm x 3cm) com uma delgada camada de petróleo em sua superfície, foi presa a uma bóia fixa e permaneceu no local por 60 dias. Ao longo desse período, foram realizadas coletas em triplicata para posterior extração do DNA dos biofilmes formados sobre a camada de petróleo nas placas. Após os 60 dias, as últimas cinco placas foram coletadas para o isolamento em meios de enriquecimento para a obtenção de colônias capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. O DNA extraído dos biofilmes foi utilizado em PCR *multiplex* para a detecção de *Bacteria*, *Archaea* e fungos e posterior análise de índices de diversidade. Água coletada no litoral da Ilha da Trindade foi utilizada em um experimento simulando diferentes estratégias de biorremediação: atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação e o conjunto das duas últimas. Nas simulações, foram utilizados nutrientes, uma bactéria isolada do próprio ambiente como inóculo (*Rhodococcus rhodochrous*), biossurfactante e petróleo previamente aquecido a 210 °C para remoção dos compostos voláteis. Foram obtidos 15 isolados capazes de crescer em meios contendo hidrocarbonetos. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base nos índices de Shannon-Weaver ( $H'$ ), dominância de Simpson ( $D$ ) e riqueza de Margalef ( $R$ ). O domínio *Bacteria* mostrou ser o mais diverso durante a colonização do óleo. Foram observadas flutuações significativas na composição da comunidade microbiana aderida ao petróleo no experimento “in situ” durante os

primeiros 30 dias de exposição do petróleo no mar. A adição de nutrientes e de biossurfactante promoveu aumento significativo da biodegradação do petróleo. O tratamento que forneceu a melhor resposta foi aquele em que foram adicionados nutrientes, inóculo e biossurfactante. Conclui-se que a bioestimulação com nutrientes e biossurfactantes, além da bioaugmentação com um isolado autóctone, são estratégias de biorremediação recomendadas em caso de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo na região litorânea da Ilha da Trindade.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Edmo Montes. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Prospecting for oil degrading bacteria and evaluation of potential bioremediation strategies for the degradation of hydrocarbons in Trindade Island.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Maurício Dutra Costa, Poliane Alfenas Zerbini and Wendel Batista da Silveira.

This study aimed the prospection of bacteria capable of using petroleum hydrocarbons as their source of carbon and energy, and the analysis of the structure and dynamics of the microbial community that colonizes the oil after its scattering in the sea. We used data from T-RFLP multiplex, and simulate and analyze the efficiency of different petroleum bioremediation strategies by Trindade Island's shoreline. For these analyses, an experiment was settled 100 meters away from Turtles Beach, an aluminum rod, measuring 1.5 meters containing 20 acrylic slabs (4 x 3 cm) with a thin petroleum layer over them, was stuck to a fixed float and rested there for 60 days. During this time, triplicates for a posterior extraction of DNA present in the biofilms formed over the oil layer were made. Passed the 60 days, the last 5 slabs were collected with the purpose of isolation in enrichment media, thus, colonies capable of using hydrocarbons as carbon source could be obtained. The biofilm DNA was used in PCR multiplex for the detection of *Bacteria*, *Archaea* and fungi and a posterior diversity analysis. Water from the island's shoreline was used in an experiment that simulates different bioremediation strategies: natural attenuation, bioestimulation, bioaugmentation and the mutual use of the last two strategies. The simulation in this experiment was conducted using nutrients, a bacteria previously isolated from the environment *Rhodococcus rhodochrous*, biosurfactant and crude oil, previously heated up to 210 °C for the elimination of the more volatile compounds. Fifteen isolates capable of growing in media containing hydrocarbon were isolated. The microbial community structure was studied based on Shannon-Weaver's index ( $H'$ ), Simpson's dominance (D) and Margalef's richness (R). The *Bacteria* domain showed to be most diversified during the oil colonization. The composition of the microbial community over the oil showed some variation in the *in situ* experiment during the first 30 days of sea exposition. The addition of nutrients and a biosurfactant generated significant raise in the oil degradation. The treatment that provided the best solution was the one with nutrients, biosurfactant and the inoculum. In conclusion, the biostimulation with nutrients and biosurfactants, along with

bioaugmentation with an autochthonous isolated, are recommended bioremediation strategies in case of accidents with oil spills by Trindade Island's coast.

## INTRODUÇÃO GERAL

Desastres ambientais causados por derramamentos de petróleo em ambientes naturais sempre foram alvos de críticas de uma grande parcela da sociedade. Entretanto, atualmente o petróleo ainda é uma fonte energética indispensável para suprir a demanda energética mundial. Em 2010, um acidente em uma plataforma de extração de petróleo no Golfo do México liberou aproximadamente 780 milhões de litros de petróleo na água, destruindo o hábitat de diversas espécies marinhas, atingindo a costa de vários estados norte-americanos e conseqüentemente afetando a vida de milhares de pessoas que viviam nessas áreas.

Vários métodos de limpeza de ambientes afetados por derramamento de óleo estão disponíveis. Contudo, consistem de métodos de alto custo e que não garantem alta eficiência na remoção dos contaminantes. Grande parte do óleo que é derramado em um ambiente natural pode ser eliminado pela atividade decompositora de microrganismos presentes no próprio ambiente. Portanto, o uso de microrganismos para atuar nas atividades de limpeza de ambientes contaminados com petróleo e derivados tem se tornado promissor em técnicas de biorremediação.

Os objetivos aqui propostos visam contribuir para o avanço do conhecimento na área de biorremediação do petróleo, com foco na região da Ilha da Trindade, situada no oceano Atlântico a aproximadamente 1.140 km da costa da cidade de Vitória/ES – Brasil.

No capítulo 1 é apresentada uma revisão bibliográfica mostrando algumas características do petróleo, a situação do Brasil no cenário mundial de produção, assim como os impactos causados por derramamentos em ambientes marinhos e também algumas maneiras de proporcionar a remoção do contaminante nesse tipo de ambiente.

No capítulo 2, “Prospecção, isolamento e caracterização de microrganismos da Ilha da Trindade com potencial para utilização em processos de biorremediação de petróleo”, são descritas a prospecção de microrganismos que utilizam o petróleo como fonte de carbono e energia, bem como as metodologias empregadas para a identificação dos isolados obtidos. Esses isolados foram utilizados em ensaios de degradação para se verificar a sua capacidade de consumirem hidrocarbonetos específicos e assim sugerir a possibilidade de serem aplicados em processos de biorremediação.

No capítulo 3, “Diversidade microbiana e avaliação da eficiência de estratégias de biorremediação de hidrocarbonetos por microrganismos nas adjacências da Ilha da Trindade – Brasil”, são avaliadas as comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e fungos que colonizam a superfície do petróleo após a inserção desse contaminante no ambiente marinho, bem como a dinâmica dessas comunidades. É realizada ainda, em laboratório, a avaliação de diferentes estratégias de biorremediação de petróleo para o entorno da Ilha da Trindade.

# CAPÍTULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. PETRÓLEO: CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES

O petróleo é uma mistura de compostos sólidos, líquidos e gasosos que ocorre em rochas sedimentares em depósitos ao redor de todo o mundo. Do ponto de vista químico, o petróleo é uma mistura complexa de moléculas composta basicamente de átomos de hidrogênio e carbono, denominadas hidrocarbonetos (1, 2). Além dos hidrocarbonetos, são encontradas também pequenas quantidades de compostos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre, bem como alguns metais (3).

Os milhares de componentes químicos que compõem o óleo cru são normalmente separados por destilação fracionada, para dar origem a diferentes produtos utilizados industrialmente.

Os combustíveis derivados do petróleo suprem aproximadamente metade da demanda energética mundial (2). Portanto, nas sociedades modernas, o petróleo representa uma das substâncias mais importantes em todo o planeta, visto que, por muitas décadas, até a atualidade, é amplamente utilizado nas atividades humanas. Esse cenário certamente continuará pelos próximos anos, enquanto energias alternativas não se tornam economicamente viáveis (4, 5).

Existem diferentes teorias para o surgimento do petróleo no planeta, sendo que a mais aceita indica que tenha ocorrido a partir de restos orgânicos, principalmente de organismos planctônicos, que se depositaram no fundo de lagos e mares, por meio de transformações químicas e físicas por milhares de anos (6–8). A maior parte do petróleo disponível atualmente foi originada por diagênese, processo pelo qual a matéria orgânica é sujeita a uma ampla gama de alterações físicas e químicas, em condições de temperatura entre 50 °C e 60 °C, e por catagênese, em que a matéria orgânica sofre alterações térmicas entre 175 °C e 200 °C (9, 10).

O Oriente Médio detém as maiores reservas de petróleo do planeta e é o principal produtor e exportador de petróleo no mundo. Atualmente, na lista dos principais países produtores, o Brasil aparece como o décimo terceiro no ranking, sendo que a extração nacional ocorre quase que exclusivamente em águas profundas (11).

### 1.1.1. Composição Físico-Química

O petróleo é constituído por milhares de moléculas diferentes de hidrocarbonetos, isto é, moléculas compostas por cadeias de carbono e hidrogênio, sejam nas formas sólida, líquida ou gasosa. Quando em condições de pressão e temperatura ambientes, o petróleo é geralmente encontrado em estado líquido (3). Uma pequena fração de moléculas contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, além de compostos organometálicos, é também encontrada (2, 12).

Os hidrocarbonetos são compostos apolares de natureza hidrofóbica (13) que constituem não apenas o petróleo, mas também plantas e animais (14). A ampla gama de combinação entre moléculas contendo carbono e hidrogênio torna o petróleo um composto onde se combinam moléculas de distintos tamanhos, conformações estruturais e conseqüentemente diferentes pesos moleculares (1).

Quando em pressão e temperatura ambientes, moléculas que contêm até quatro átomos de carbono existem em estado gasoso; moléculas que possuem entre cinco e quinze átomos de carbono são líquidas; e as moléculas mais pesadas, ou seja, as que contêm mais de dezoito átomos de carbono, ocorrem como sólidos (1, 15).

Os hidrocarbonetos podem ser classificados em alifáticos, cicloalifáticos e aromáticos (16, 17). Na tabela 1 são exemplificados alguns hidrocarbonetos e suas características (18, 19). A estrutura molecular dos hidrocarbonetos pode variar desde cadeias de fita simples até mais complexas, com cadeias ramificadas ou estruturas cíclicas (3). Os hidrocarbonetos aromáticos são os representantes mais tóxicos, seguidos pelos cicloalifáticos, olefinas e, por fim, os alifáticos.

De acordo com Zílio & Pinto (20), a composição do petróleo pode ser definida pelo teor de:

- hidrocarbonetos saturados, que incluem alcanos de cadeia simples e ramificada (compostos parafínicos) e cicloalcanos (compostos naftênicos);
- hidrocarbonetos aromáticos, incluindo moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (compostos nafteno-aromáticos) e, em alguns casos, compostos cíclicos de enxofre;
- resinas e asfaltenos, que correspondem aos compostos policíclicos, com alto peso molecular, os quais possuem átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

**Tabela 1.**Características e exemplos das principais classes de hidrocarbonetos

<b>Hidrocarbonetos</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Alifáticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• são menos densos que a água;</li> <li>• o tamanho da molécula é inversamente proporcional à sua volatilidade e hidrossolubilidade.</li> </ul>	Metano, propano, butano (gases a temperatura ambiente); hexano, octano, hexadecano (líquidos à temperatura ambiente); eicosano, triacontano, pentacontano (sólidos em temperatura ambiente)
<b>Cicloalifáticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• possuem até 6 átomos de carbonos em forma de anel</li> <li>• são bastante resistentes à degradação microbiana</li> </ul>	Ciclohexano, metilciclohexano, metilciclopentano, 1,2-dimetilciclopentano
<b>Aromáticos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• muito voláteis e relativamente didrossolúveis</li> <li>• possuem anel benzênico</li> <li>• alguns são resistentes à degradação microbiana</li> </ul>	Benzeno, naftaleno, tolueno, xileno e fenantreno.

Adaptada de Morrison, 1985 (19).

O óleo cru é solúvel na maior parte dos solventes derivados de petróleo. Essa propriedade pode variar de acordo com o tipo e quantidade dos hidrocarbonetos presentes, assim como as impurezas nele contidas (3).

O óleo cru e seus derivados podem ser classificados por suas densidades, em uma escala hidrométrica expressa como grau API, criada pelo *American Petroleum Institute*. De acordo com essa escala, os óleos podem ser classificados em:

- Óleo Leve: apresenta grau API maior que 31.1° (densidade menor que 870 kg/m<sup>3</sup>);
- Óleo Médio: apresenta grau API entre 22.3 ° e 31.1° (densidade variando entre 870 e 920 kg/m<sup>3</sup>);
- Óleo Pesado: apresenta grau API entre de 10.0 ° e 22.3 ° (densidade variando entre 920 e 1.000 kg/m<sup>3</sup>);
- Óleo Ultra Pesado: apresenta grau API abaixo de 10.0 ° (densidade maior que 1.000 kg/m<sup>3</sup>).

### 1.1.2. Exploração e Produção de Petróleo no Brasil

No Brasil, a atividade exploratória do petróleo ocorre por meio da aquisição de dados provenientes de pesquisas em bacias sedimentares, por empresas de aquisição

especializadas, instituições acadêmicas ou pela própria Agência Nacional do Petróleo (ANP). Essas informações são de natureza sísmica ou não-sísmica. Através dos dados obtidos, poços são perfurados para comprovar a existência do óleo no local. Somente em 2011, foi realizado o procedimento de perfuração em 669 poços em território nacional, com uma taxa de sucesso exploratório de 43,05 %, considerando-se campos *onshore* e *offshore* (11).

As reservas de petróleo em território brasileiro figuram entre as maiores do planeta, colocando o Brasil, segundo a ANP, como o 13 ° no ranking mundial de reservas petrolíferas. No final de 2011, as reservas brasileiras de petróleo foram estimadas em 30,1 bilhões de barris, um acréscimo de 5,7% em comparação com o ano anterior (11).

A produção nacional é voltada principalmente para regiões *offshore*, sendo que 93,6 % das reservas já provadas estão localizadas em mar. Os maiores campos de exploração no Brasil estão localizados nas bacias de Campos e Santos, com destaque para a costa do estado do Rio de Janeiro, que detém 87,8% das reservas provadas *offshore* (11).

Entre os anos de 2002 e 2011, houve um crescimento médio anual de 4,2 % na produção nacional de petróleo. Em 2011, um total de 9.043 poços de exploração estavam ativos, sendo que dos campos marítimos foram extraídos 91,4 % dos 768,5 milhões de barris de óleo, com densidade média de 24,36 graus API (11).

O grande potencial de exploração gerado pela descoberta de petróleo no intervalo de rochas que se estende por baixo de uma extensa camada de sal, que pode chegar a uma profundidade de até 7 mil metros, popularmente conhecido como Pré-Sal, abre novas possibilidades para o aumento da produção, o qual, segundo a Petrobras, chegará a mais de 1 milhão de barris por dia em 2017. Hoje já ocorre a produção de 300 mil barris por dia provenientes exclusivamente das reservas no Pré-Sal. Novas descobertas indicam a presença de reservas de petróleo de alta qualidade, localizadas entre os estados de Santa Catarina e Espírito Santo (21).

### **1.1.3. Contaminação de Ambientes Marinhos por Petróleo**

Como a exploração brasileira ocorre predominantemente em águas profundas, as possibilidades de derramamentos em pequenas e grandes escalas aumentam tanto nas regiões de produção como nas rotas de transporte no mar (11, 12). Não é incomum

ocorrerem incidentes envolvendo derramamento durante o transporte marítimo, nas plataformas petrolíferas ou mesmo provenientes do escoamento urbano. Esses incidentes são denominados derramamentos ocasionais e interferem diretamente na biota local e nas adjacências das regiões afetadas (22).

A descoberta de novos campos de exploração de petróleo na costa brasileira põe em risco uma maior quantidade de ecossistemas costeiros, que poderão sofrer com possíveis impactos gerados por derramamentos de óleo (23). Dentre os ambientes que podem ser impactados, caso ocorram derramamentos de petróleo nessas regiões de exploração, estão diversas ilhas e ilhotas oceânicas, que são habitat de espécies endêmicas de plantas e animais e provavelmente microrganismos, além de servirem como pontos de apoio para diversas aves migratórias, mamíferos e tartarugas marinhas (24). Dessa forma, qualquer derramamento de petróleo pode causar graves problemas ambientais.

Ao ser derramado na água, o óleo se espalha, formando uma camada de poucos milímetros de espessura sobre a lâmina d'água (25). O óleo causa uma quebra abrupta na vida marinha na área afetada nos primeiros dias (26). Os componentes voláteis presentes no óleo evaporam rapidamente após o derramamento. Esses componentes voláteis apresentam menor peso molecular e incluem os componentes mais tóxicos do petróleo (12, 27). Diversos fatores como luminosidade, temperatura, movimentos do mar, microbiota local, dentre outros, atuam diretamente na capacidade de evaporação dessas frações leves e voláteis. Por um processo denominado fotólise, a radiação ultravioleta do sol é capaz de oxidar alguns dos hidrocarbonetos que compõem o óleo, originando produtos como componentes ácidos e fenólicos, que podem ser mais tóxicos que os hidrocarbonetos iniciais (24, 28, 29).

Alguns hidrocarbonetos são solúveis em água e dissolvem-se no mar, principalmente os que possuem baixo peso molecular (12, 30, 31). Apesar de serem os componentes mais tóxicos, essa solubilização ocorre com cerca de apenas 1 % do óleo derramado e esses compostos podem rapidamente ser degradados por microrganismos (24).

As frações mais pesadas de óleo podem ser direcionadas para o leito oceânico, especialmente após adsorção a material particulado presente na coluna d'água. Normalmente isso ocorre em pequenas proporções e, em alguns casos, o óleo pode ser metabolizado rapidamente por organismos bentônicos (24), enquanto que em outros, pode permanecer por um grande período de tempo no sedimento oceânico (26).

Sob condições específicas do oceano, pode ocorrer a formação de uma emulsão entre o óleo e a água do mar. Esse processo envolve a mistura de gotículas de água com menos de 0,1 mm de diâmetro com o óleo que está flutuando (24). Essa emulsão pode conter de 20 a 90 % de água do mar, formando uma substância viscosa denominada mousse (32–34).

A formação e a estabilidade da mousse dependem do tipo do óleo derramado (34). Mesmo sob condições de mar calmo, a mousse pode ser formada; entretanto, em condições de mar agitado, a formação da mousse ocorre mais rapidamente, tornando-a mais estável, viscosa e com maior percentual de volume de água. A persistência da mancha de petróleo, assim como a densidade e a viscosidade da própria mousse, aumentam proporcionalmente de acordo com a agitação do mar e com a proporção de compostos de alto peso molecular no óleo, como resinas e asfaltenos (34, 35). A emulsão torna-se ainda mais estável quando as temperaturas ambientes são baixas (32). A densidade da mousse é influenciada também pela salinidade da água que a compõe. Quanto maior a concentração de sal, mais densa a mousse pode tornar-se e, assim, aumenta-se a possibilidade de essa descer pela coluna d'água e chegar à região bentônica (33).

Caso o derramamento ocorra distante da costa, o tempo até afetar a vida costeira permite que uma parte significativa dos hidrocarbonetos evapore e se disperse no mar. Apesar disso, as condições do mar podem permitir a formação da mousse que, ao atingir a costa, causa danos à biota local. A mousse adere-se a plantas e animais, causando uma mortandade em massa no ambiente afetado em razão de seus efeitos tóxicos crônicos (36).

## **1.2. BIODEGRADABILIDADE E TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS**

A biodegradação de hidrocarbonetos por populações microbianas em ambientes naturais é dependente de fatores físicos, químicos e biológicos do meio. As taxas de degradação dependem da composição, densidade do óleo e concentração dos hidrocarbonetos, assim como sua dispersão e emulsificação. Temperatura, concentração de oxigênio e nutrientes estão entre as variáveis mais importantes. A salinidade e a pressão afetam as taxas de biodegradação em ambientes aquáticos. Primariamente, hidrocarbonetos são degradados por algas, arqueas, bactérias e fungos, que os utilizam como fontes de carbono e energia (37–39).

A complexidade da estrutura química dos hidrocarbonetos está inversamente relacionada com a capacidade de degradação por microrganismos. Hidrocarbonetos aromáticos de baixa massa molecular como benzeno, tolueno e xileno são componentes tóxicos e causam efeitos imediatos de toxicidade no ambiente afetado, mas podem ser degradados com facilidade por microrganismos ambientais (37, 40, 41). Já moléculas que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados ou ramificações são mais difíceis de serem degradadas e uma menor quantidade de microrganismos possui tal capacidade. Se comparadas a moléculas mais simples, essas apresentam menor toxicidade: entretanto, são mais persistentes no ambiente e causam efeitos duradouros, denominados efeitos tóxicos crônicos (36, 42).

### **1.2.1. Biodegradação**

Microrganismos que degradam hidrocarbonetos são largamente distribuídos em ecossistemas marinhos, limnológicos e em solos (40). A biodegradabilidade de hidrocarbonetos por microrganismos representa um dos mecanismos primários para se eliminar petróleo e seus derivados de ambientes contaminados (43). Os vários fatores, bióticos e abióticos, envolvidos na degradação de hidrocarbonetos, despertam interesse e são objetos de pesquisas na comunidade científica (38, 44–47).

Dadas as diferentes conformações e pesos moleculares dos hidrocarbonetos, a susceptibilidade à biodegradação é distinta entre esses compostos; a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos presentes no óleo geralmente diminui de acordo com a complexidade da molécula, sendo os *n*-alcanos os mais fáceis de serem degradados, seguidos por alcanos de cadeia ramificada, alquenos ramificados, *n*-alquil ramificados de baixo peso molecular, monoaromáticos, alcanos cíclicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e, por fim, os asfaltenos, que dificilmente são degradados por ação de microrganismos (48). A biodegradação envolve o catabolismo dos hidrocarbonetos, o qual resulta em moléculas menos complexas que, após completa mineralização, são transformadas em água e dióxido de carbono, em condições aeróbicas, ou metano, em condições anaeróbicas (37).

A formação de emulsões pela produção e liberação de biossurfactantes por populações microbianas exerce um importante papel na captação dos hidrocarbonetos por bactérias e fungos (49–51). Apesar de serem importantes membros da comunidade

microbiana em ambientes aquáticos, pouco se sabe a respeito de biodegradação de hidrocarbonetos por protozoários e algas (52).

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo em ambientes naturais sofre influência das populações de microrganismos autóctones que possuem a capacidade fisiológica de degradar esses compostos, além de vários fatores abióticos, que vão interferir no crescimento e na atividade desses microrganismos (37, 38). A persistência do contaminante depende, quantitativa e qualitativamente, dos hidrocarbonetos que compõem o óleo. Porém, em alguns ambientes, os hidrocarbonetos podem persistir indefinidamente, enquanto em outros, sob influência de diferentes variáveis físico-químicas, podem ser rapidamente degradados pela microbiota local (43).

A temperatura influencia na biodegradação do petróleo, pois interfere na viscosidade do óleo e características como fluidez e solubilidade, no metabolismo dos microrganismos e também na composição das comunidades microbianas. Quando em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, enquanto a volatilização de componentes tóxicos, assim como a atividade microbiana, são reduzidas (53, 54). Entretanto, já foi relatada a biodegradação de hidrocarbonetos em baixas temperaturas (55), havendo relatos de degradação entre 0 °C (56) e 70 °C (57, 58).

O oxigênio é outro fator limitante, visto que esse composto é utilizado por enzimas oxigenases para promover a oxidação de hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos. Na coluna d'água em ambientes marinhos, normalmente o oxigênio não é um fator limitante, principalmente em se tratando de regiões costeiras, exceto regiões de baías(43). Dada a complexidade de substratos presentes no petróleo, pode ocorrer ainda a co-oxidação de compostos por microrganismos. Muitos hidrocarbonetos ramificados e cíclicos são removidos de ambientes contaminados com petróleo como resultado da co-oxidação (59, 60).

Ao ocorrer a contaminação de um ambiente por hidrocarbonetos, as razões de carbono:nitrogênio e carbono:fósforo são muito grandes, o que não é favorável ao crescimento microbiano (61). Nesse cenário, nitrogênio e fósforo se tornam fatores limitantes para a biodegradação do contaminante e o ajuste das razões carbono:nitrogênio:fósforo por meio da adição de compostos inorgânicos nitrogenados e fosfatados possibilitam o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a utilização dos hidrocarbonetos como fonte de carbono (62).

A pressão é um fator que deve ser levado em consideração quando se trata de biodegradação em águas profundas. Colwell & Walker (43) propuseram que, quando o

óleo chega ao leito oceânico e é submetido a altas pressões, a degradação por populações microbianas ocorre de forma muito lenta e, dessa maneira, frações recalcitrantes do óleo permanecem no ambiente por muitos anos.

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é descrita para diversos gêneros microbianos. Dentre esses, alguns são muito bem conhecidos por possuírem representantes que utilizam hidrocarbonetos em meio aquático, como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter* e *Corynebacteria* (37, 40, 63–66). Alguns microrganismos utilizam apenas compostos aromáticos, enquanto outros utilizam apenas alcanos, mas alguns são capazes de utilizar ambos os tipos de hidrocarbonetos (40, 43).

Em ambientes marinhos sem registros de contaminação antrópica por petróleo, microrganismos que utilizam hidrocarbonetos constituem menos que 0,1% da comunidade microbiana total, enquanto que, em ambientes poluídos com petróleo, eles podem representar até 100% dos microrganismos viáveis (40). Para se adaptarem às novas condições do meio, as populações que formam a comunidade microbiana devem sofrer alterações fisiológicas e genéticas, essas resultantes, principalmente, da transferência horizontal de genes contidos em elementos genéticos móveis, que estão envolvidos no metabolismo dos contaminantes presentes (67).

### **1.2.2. Efeitos Tóxicos dos Hidrocarbonetos de Petróleo**

Dentre os biomas mundiais, o ambiente marinho é o que mais recebe dejetos e produtos contaminantes provenientes de ações antrópicas. Os estuários estão dentre os habitats biologicamente mais produtivos do planeta e encontram-se frequentemente sob ameaça por atividades humanas, dentre elas, derrames de petróleo e seus derivados (68).

Os problemas e efeitos imediatos resultantes do contato direto com o óleo derramado no ambiente, facilmente visualizados, como incrustação em rochas, areia, animais e plantas, além do desequilíbrio causado nas comunidades microbianas são conhecidos pela comunidade científica e pela sociedade (36, 37, 69). Além desses efeitos imediatos, existem ainda os efeitos subletais e crônicos sentidos pela biota do meio durante um longo período de tempo, que são mais difíceis de serem detectados (36, 42, 69, 70).

A predominância da toxicidade aguda ou crônica no ambiente impactado depende principalmente do tipo de óleo derramado. Quando se tem óleos de alta densidade, o efeito físico de recobrimento é predominante, enquanto que com óleos de baixa densidade, o efeito químico é o mais representativo. Como os compostos mais tóxicos são mais solúveis e voláteis, a toxicidade química é sentida nos primeiros dias e semanas após o derramamento, visto que, por ações abióticas e pela biodegradação por microrganismos, esses componentes são eliminados do ambiente(71). Os alcanos, conhecidos como parafinas, representam grande parte do óleo cru e podem causar efeitos anestésicos e narcotizantes. O contato dos organismos com frações tóxicas do óleo, tanto as de baixo quanto alto peso molecular, pode resultar em morte por intoxicação, principalmente associada a compostos aromáticos (2, 72).

Dentre os hidrocarbonetos que exercem efeitos tóxicos crônicos na biota, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são contaminantes generalizados no ambiente, e seus efeitos tóxicos tem sido alvos de diversas pesquisas (72–75).

Embora os alcanos sejam de fácil degradação por microrganismos, aqueles que possuem entre 5 e 10 átomos de carbono podem inibir a atividade de degradação, pois eles podem romper a membrana citoplasmática desses microrganismos (76). Os hidrocarbonetos de líquidos de baixo peso molecular apresentam efeito tóxico agudo, principalmente devido a sua elevada solubilidade e consequente biodisponibilidade em água (71).

Uma vez presentes em ambiente marinho, principalmente em áreas costeiras, os PAHs rapidamente se associam com material particulado em suspensão na água, em razão de sua baixa solubilidade em água e elevada hidrofobicidade (77), sendo consequentemente depositados no sedimento. Desta forma, o sedimento se torna um reservatório de contaminantes que exercem efeitos ecotoxicológicos na biota marinha durante muito tempo. A baixa solubilidade em água, a difícil volatilização e propriedades recalcitrantes aumentam a persistência e a possibilidade de acúmulo desses compostos no ambiente (78). Alguns PAHs são conhecidos por causarem danos ao DNA e assim induzir mutações e exercer efeitos carcinogênicos (72, 75). Algumas pesquisas relataram que os PAHs são os principais mutagênicos presentes em sedimentos (73) e que existe uma correlação positiva entre mutagênese e a contaminação com PAH (74).

Além dos danos genéticos, outros efeitos, como prejuízo nas taxas de crescimento e sucesso reprodutivo, aumento da sensibilidade a patógenos e danos

irreversíveis ao sistema imunológico de seres vivos, podem ser causados pelos hidrocarbonetos (68, 79).

### 1.2.3. Impactos dos Hidrocarbonetos na Biota

Para se avaliarem os impactos gerados por desastres ambientais com petróleo, assim como os riscos para as atuais e futuras gerações de indivíduos da biota local, é necessária a avaliação de diversos fatores, a aplicação de diferentes modelos com as variáveis do ambiente e também o monitoramento de alguns deles (70). Na literatura são encontradas pesquisas relacionadas aos impactos causados por óleo em ambientes naturais (23, 80–82).

O acidente envolvendo o navio *Exxon Valdez* em 24 de março de 1989, no Alasca, foi de grande magnitude e desde então foi alvo de pesquisas (81). Naquela ocasião, foram liberados 42 milhões de litros de óleo cru no mar, o que levou à contaminação de 1.990 km de costas, sendo a enseada “Prince William” a mais prejudicada. A contaminação influenciou negativamente o crescimento de algas, em razão da toxicidade dos hidrocarbonetos e, conseqüentemente, resultou em um grande desequilíbrio em toda a cadeia trófica do ambiente. A abundância de ictiofauna, caranguejos, estrelas-do-mar e invertebrados declinou rapidamente, da mesma maneira que anfípodas sensíveis aos componentes tóxicos do óleo. Entretanto, algumas comunidades de invertebrados, especialmente oligoquetos e poliquetos, apresentaram um aumento na abundância, o que provavelmente ocorreu não só em decorrência do aumento do número de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, mas também da redução de seus predadores (83). Em estudos posteriores, Carls *et al.* (80) verificaram que seis anos após o desastre ainda persistiam plumas e sedimentos contaminados com óleo, ou seja, uma fonte de contaminação para espécies locais.

Aves, tartarugas e mamíferos marinhos necessitam com alta frequência entrar em contato com a superfície da água; portanto, o óleo que cobre a lâmina d’água incrusta nesses animais, causando um rápido declínio nas populações (81). Ao lubrificar as penas e os pelos dos animais, o óleo faz com que percam a capacidade de isolamento térmico, podendo causar morte por hipotermia, além de asfixia, afogamento e morte pelo próprio contato e ingestão de hidrocarbonetos tóxicos (82). O estresse térmico causado pelo óleo aderido à superfície corporal ameaça lontras marinhas e

ursos polares, à medida que resulta em diminuição da temperatura corpórea e aumento da taxa metabólica (84).

### **1.3. ESTRATÉGIAS DE REMEDIAÇÃO AMBIENTAL DE PETRÓLEO EM AMBIENTES MARINHOS**

Dentre as alternativas de remediação em casos de derramamentos de petróleo e seus derivados estão os tratamentos físicos, químicos e biológicos. Os tratamentos físicos e químicos geralmente causam a dispersão de parte do poluente e não sua efetiva remoção, tornando sua eficácia limitada, além de apresentarem custo elevado. Já a remoção através da remediação por microrganismos, se comparada aos outros métodos, apresenta baixo custo, alta eficiência e não causa poluição secundária (85, 86), o que torna esse método uma alternativa competitiva como processo de mitigação dos impactos causados pela contaminação por hidrocarbonetos do petróleo. Dentre as tecnologias de remediação existentes, nenhuma fornece uma alta eficiência da remoção dos contaminantes, sendo que a eficácia de remoção de poluentes de ambientes contaminados pode ser potencializada quando são utilizadas metodologias de remediação em conjunto (87).

O petróleo e seus derivados, quando introduzidos em ambientes marinhos, sofrem uma grande variedade de mudanças por condições físicas, químicas e biológicas, incluindo evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, emulsificação, adsorção em matérias particuladas e sedimentação, além de biodegradação (42, 88). Esses processos ocorrem simultaneamente e alguns resultam em mudanças nas propriedades físicas e químicas do poluente, o que afeta diretamente o tempo de permanência dos hidrocarbonetos no ambiente (37).

#### **1.3.1. Remediação Física e Química**

As formas de remediação físicas e químicas consistem na inserção de equipamentos ou compostos químicos no ambiente contaminado, com o objetivo de ajudar a recuperar e dispersar/solubilizar o petróleo derramado. Do ponto de vista biológico, os produtos químicos utilizados no tratamento podem apresentar alta toxicidade, consistindo em um risco ecológico(89). Ao entrarem em contato com organismos aquáticos, esses compostos podem interferir na embriogênese, crescimento

larval, sobrevivência e levar a alterações morfológicas dos indivíduos da biota local. Em fase inicial de vida, um organismo é mais sensível às perturbações em comparação com estágios adultos; portanto, espécies com rápido ciclo de vida estão mais susceptíveis a sofrer efeitos de toxicidade (90, 91).

Ao dispersar o óleo cru quimicamente na água, Fucik & Balcom (90) demonstraram que uma maior concentração de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) ficam dispersos na coluna d'água, quando comparado a um cenário em que o óleo dispersa naturalmente no mar. Uma alternativa à dispersão para a remoção é queimar o óleo que está na superfície. Gundersen *et al.* (91) demonstraram que a fração solúvel em água de um óleo parcialmente queimado foi 10 vezes menor que de óleo cru; porém, a fração solúvel que permanece na coluna d'água possui maior potencial de toxicidade aguda para algumas espécies do meio. Em contrapartida, também é demonstrado que a queima do óleo tem menor, ou nenhum efeito tóxico para a biota (92). A dispersão, sem a efetiva remoção de hidrocarbonetos da água, aumenta a probabilidade de que animais marinhos tenham contato com o contaminante, seja por vias respiratórias, difusão pela pele e por alimentação, surgindo, assim, o problema de bioacumulação em tecidos vivos (69, 93).

Barreiras de contenção podem ser utilizadas para bloquear e direcionar a mancha do óleo para áreas em que o recolhimento seja mais fácil, assim como para impedir que a poluição atinja áreas de interesse ecológico/sócio-econômico. Equipamentos como “skimmers” e absorventes granulados podem ser utilizados para o recolhimento do óleo (94, 95). O recolhimento do óleo depende das condições de clima, maré e principalmente das suas propriedades físico-químicas. Apesar de não causar distúrbios no ambiente, o recolhimento de óleo com barreiras é ineficiente para retirar do ambiente frações que se solubilizam na água, assim como frações que ao serem adsorvidas em material particulado migram para o ambiente bentônico (24, 78, 96). A lavagem do óleo que aderiu a rochas e areia na região costeira também é uma alternativa normalmente utilizada. Dependendo da situação, são realizadas estratégias em que se emprega água fria ou água quente, com baixa ou alta pressão (97).

Para se diminuir a dispersão do óleo na água, podem ser utilizados agentes químicos conhecidos como desemulsificantes, que impedem a formação de emulsões de óleo com água. Solidificantes podem ser utilizados com o intuito de aumentar a polimerização do óleo e, assim, causar sua estabilização, visando minimizar o espalhamento da mancha e tornar mais fáceis e efetivas às operações de remoção física.

Existem, ainda, produtos químicos que podem ser aplicados em substratos nas regiões costeiras, para prevenir que o óleo fique aderido a rochas e sedimentos, tornando mais eficiente o processo de lavagem com alta pressão (97).

Dispersantes químicos podem ser pulverizados sobre a mancha de óleo, utilizando navios ou aviões, o que acelera o processo de dispersão do óleo, assim como sua solubilidade e facilidade de degradação por microrganismos. Os surfactantes agem como um detergente e possuem uma fração lipofílica e outra hidrofílica, o que propicia afinidade tanto com água quanto com óleo. Sendo assim, quando aplicado sobre uma fina camada de óleo, o surfactante difunde-se na interface água/óleo; a fração lipofílica se liga à molécula de óleo e a hidrofílica se liga à água, o que reduz a tensão interfacial entre essas duas fases (98). Isso permite a formação de micelas do surfactante com partículas de óleo agregadas, tornando o óleo mais solúvel e mais acessível para a biodegradação por microrganismos. Porém, o tipo de óleo, as condições climáticas, a dimensão e a localização da mancha devem ser avaliados, pois a eficiência é baixa quando o óleo é de alta densidade, assim como deve haver agitação do mar para que o surfactante promova a formação das micelas (95).

Apesar da solubilização do óleo pela utilização de surfactantes ser útil para minimizar os impactos causados pela mancha de óleo em ambientes marinhos e costeiros, existe a necessidade de remoção dos contaminantes que permanecem na água, visto que as porções que continuam no ambiente podem resultar em um desastre ecológico “silencioso”, ao intoxicar de maneira crônica toda a biota do ecossistema contaminado (36, 69).

### **1.3.2. Biorremediação**

O uso de micro-organismos para atuar na descontaminação de ambientes em diversos ecossistemas é considerado promissor e eficaz. Microrganismos com capacidade de degradar petróleo são ubíquos, mas geralmente ocorrem em pequena proporção nas comunidades microbianas. Centenas de espécies, dentre bactérias, arqueas e fungos, podem degradar hidrocarbonetos provenientes do petróleo (40, 66, 99).

A biorremediação de locais contaminados depende das capacidades metabólicas dos microrganismos para converterem os poluentes orgânicos em compostos que não apresentam toxicidade ou que ao menos sejam menos danosos ao ambiente (100).

Sob condições aeróbias, muitos hidrocarbonetos do petróleo podem ser biodegradados, embora compostos como resinas, moléculas polares e asfaltenos dificilmente possam ser catabolizados por microrganismos. Óleos com densidade leve contêm grande proporção de hidrocarbonetos de moléculas simples e com baixo peso molecular, que são mais facilmente metabolizados por microrganismos degradadores; óleos com densidades maiores possuem hidrocarbonetos de moléculas maiores e com maior peso molecular, que são mais recalcitrantes. Os PAHs geralmente ocorrem em baixa concentração em óleo cru, porém são altamente tóxicos e de difícil remoção do ambiente contaminado (99). Bactérias podem converter PAHs completamente em dióxido de carbono e água na presença de oxigênio, por meio da ação de enzimas dioxigenases (37). Alguns microrganismos também conseguem degradar hidrocarbonetos em condições de anaerobiose, porém é menos vantajoso energeticamente quando comparado com a aerobiose (99, 101).

As tecnologias empregadas para biorremediação podem ser classificadas como *ex situ* e *in situ*. Quando *ex situ*, o material contaminado é retirado do ambiente e tratado em outro local. As tecnologias *in situ* aparecem com diversas vantagens, pois não requerem a retirada e transporte do material contaminado. Os processos de remediação *in situ* utilizados em campo são classificados como: atenuação natural ou bioatenuação, bioaumentação e bioestimulação (102). Na tabela 2 são mostrados alguns resultados de trabalhos empregando estratégias de biorremediação *in situ*.

**Tabela 2.** Estudos de estratégias de biorremediação em ambientes marinhos

<b>Estratégia</b>	<b>Características</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<b>Atenuação Natural</b>		Remoção de 97 % do fluoreno e 99 % do fenantreno após 14 dias	
<b>Bioaumentação</b>	Sedimento de maguezal (4 g) contaminado com fluoreno, fenantreno e pireno (400 mg cada) em 40 mL de água do mar artificial.	Remoção de 97 % do fluoreno após 14 dias e 97 % do Fenantreno após 28 dias.	(101)
<b>Bioestimulação</b>	Sedimento de maguezal (4 g) contaminado com fluoreno, fenantreno e pireno (400 mg cada) em 40 mL de meio salino mineral (MSM).	Remoção de 97 % de fluoreno, Fenantreno e pireno após 28 dias.	
<b>Bioestimulação</b>	Água do mar contaminada com diesel + NaNO <sub>3</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (razão de N:P igual a 10:1)	Remoção de 24,6 % do diesel após 32 dias	(103)
<b>Bioestimulação</b>	Água do mar contaminada com óleo cru leve (1 g/L), utilizando KNO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (razão N:P igual a 10:1)+ surfactante químico	Remoção de 53,4 % dos hidrocarbonetos totais do petróleo após 28 dias.	(104)
<b>Bioaumentação + Bioestimulação</b>	Água do mar contaminada com óleo cru (1 g/L) + surfactante químico + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (razão N:P igual a 10:1)	Remoção de 85,35 % do total de <i>n</i> -alcanos.	
<b>Bioaumentação + Bioestimulação</b>	Água do mar contaminada com óleo cru (0,5 % p/v); KNO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (razão C:N:P igual a 100:10:1) + ramnolípideo + cultura de microrganismos pré-adaptados	Remoção de 99 % dos <i>n</i> -alcanos (C <sub>14</sub> -C <sub>35</sub> ) em 15 dias.	(105)

### 1.3.2.1. Atenuação Natural

O método de atenuação natural é baseado na redução da concentração dos contaminantes do ambiente por processos naturais de degradação. É uma tecnologia que requer modelagens da evolução da eliminação dos poluentes. Portanto, são necessárias caracterização da área afetada, amostragens em locais específicos da região afetada e análises químicas para que seja verificada a degradação do contaminante no ambiente natural ao longo do tempo(102). Sob certas condições, a atenuação natural é uma metodologia bastante empregada, por exemplo, em áreas costeiras e para se

monitorar águas subterrâneas, visto que, por restrições tecnológicas e monetárias, este tipo de biorremediação aparece como uma forma viável, pois métodos invasivos de limpeza podem ser prejudiciais para a biota local (106, 107).

Em áreas costeiras a atenuação natural reduz as concentrações de óleo, pois ocorre evaporação por fatores como temperatura e movimentação das ondas e o oxigênio dissolvido presente em abundância deixa de ser um fator limitante para o crescimento microbiano, apesar de fósforo e nitrogênio em baixas concentrações se apresentarem como fatores limitantes no processo (108, 109).

Na coluna d'água, ou na região bentônica, a degradação por microrganismos é mais lenta, pois aceptores de elétrons, principalmente o oxigênio, não estão disponíveis em grandes quantidades para que possa ser realizada a oxidação dos hidrocarbonetos, podendo ainda haver deficiência de nutrientes minerais e baixas temperaturas. Algumas bactérias podem realizar a biodegradação de hidrocarbonetos utilizando formas oxidadas de compostos inorgânicos, por exemplo, o  $\text{Fe}^{+3}$ . O oxigênio também se torna limitante nos locais próximos ao centro da mancha de óleo, onde a degradação ocorre de maneira mais lenta (110, 111).

Em 2002, um acidente envolvendo o derramamento de óleo pesado a algumas centenas de quilômetros de distância da costa da Espanha, o qual chegou a atingir a costa do país, foi objeto de estudo de Gallego *et al.*(112). Após um ano do acidente, sem realizar qualquer tipo de interferência no ambiente, verificou-se que aproximadamente 100% dos alcanos lineares de baixo peso molecular, e 35% dos hidrocarbonetos aromáticos, como pireno, não estavam mais presentes no ambiente. Através de imagens de microscopia, foi possível notar a presença de um consórcio microbiano metabolicamente ativo degradando os hidrocarbonetos. Após o derramamento e conseqüente emulsificação, dispersão e dissolução do óleo na água, além da biodegradação, a evaporação e a oxidação fotoquímica são outros dois processos muito efetivos na remoção de frações do óleo (97).

### **1.3.2.2. Bioaugmentação**

A bioaugmentação é uma estratégia de biorremediação que, para ser aplicada, deve partir da premissa de que a capacidade metabólica da comunidade microbiana autóctone não é suficiente para catabolizar os poluentes, e que, ao ser aumentada a diversidade genética no meio, o processo de limpeza será otimizado, levando a uma

maior eficiência do processo de biodegradação. A bioaumentação pode ser definida como uma estratégia de melhoria da capacidade de um ambiente contaminado para eliminar ou amenizar os efeitos da poluição pela introdução de linhagens específicas ou consórcios microbianos capazes de catabolizar os compostos poluentes (43, 100, 113).

Nos trabalhos de McKew *et al.*(113) a bioaumentação, testada em microcosmos, foi uma estratégia eficiente para acelerar a degradação de componentes como *n*-alcanos, alcanos ramificados e PAHs nos primeiros cinco dias após a contaminação. Bao *et al.*(85) também notaram que, ao aplicarem um consórcio microbiano para degradar óleo cru, a maior taxa de biodegradação do óleo ocorreu nos dias iniciais após a contaminação.

O sucesso da bioaumentação, assim como de qualquer outra estratégia de biorremediação, depende das condições ambientais do local contaminado. Isso é relevante quando se trata de bioaumentação, visto que os microrganismos que serão introduzidos no ambiente devem ter a capacidade de se adaptar de forma rápida às condições do meio. As metodologias comumente utilizadas para a aplicação da estratégia de bioaumentação são: adição de linhagens puras pré-adaptadas, adição de consórcios microbianos pré-adaptados, introdução de bactérias modificadas geneticamente com um conjunto de genes relevantes para a biodegradação, e que por conjugação podem ser transmitidos para microrganismos autóctones (100).

De uma perspectiva aplicada, o uso de um consórcio microbiano é mais vantajoso quando comparado ao uso de uma cultura pura, uma vez que existe uma maior diversidade metabólica e maior possibilidade de adaptação em campo (114, 115). Nesse sentido, o uso de consórcios microbianos aparece como uma alternativa para atuar na limpeza de locais contaminados com óleo e também quando são co-contaminados por outro agente poluidor. No caso específico de contaminação por óleo cru, em razão da diversidade de hidrocarbonetos presentes, a aplicação de um consórcio de microrganismos pode otimizar o processo, à medida que o produto da degradação de um microrganismo pode ser o substrato de outro. Além disso, em especial quando se trata de co-contaminação, alguns microrganismos podem ter sua atividade metabólica inibida por algum contaminante presente no ambiente. Dessa forma, quando se tem um consórcio, outro microrganismo que tenha se adaptado àquelas condições pode degradá-lo e permitir o estabelecimento das demais populações antes inibidas, garantindo o sucesso da metodologia de biorremediação (116).

Do ponto de vista ecológico, existem barreiras para o sucesso da bioaumentação. Alguns fatores, como a relação dos microrganismos inoculados com novos fatores bióticos e abióticos, vão interferir na sobrevivência e atividade metabólica do inóculo. Dentre os fatores bióticos, a predação por protozoários e competição com microrganismos autóctones por nutrientes e aceptores de elétrons são elementos adversos para a bioaumentação (117). Em ambientes marinhos, os principais fatores a serem considerados são a adaptação à salinidade, concentração de oxigênio e a movimentação da água. As condições de estresse que ocorrem após a transferência de microrganismos provenientes de um meio de cultivo para o ambiente contaminado normalmente resultam na diminuição das populações dos microrganismos inoculados. Variáveis como flutuações de temperatura, pH, concentrações de nutrientes e a toxicidade dos contaminantes podem resultar em baixa eficácia do processo (118). Goldstein *et al.* (119) demonstraram que microrganismos que possuem a capacidade de degradar poluentes orgânicos em culturas falharam quando foram inseridos em ambientes naturais. Apesar de não se saber ao certo qual o motivo, surgem como possibilidades a falha na adaptação, insuficiência de substrato, competição com microrganismos autóctones, preferência pelo uso de outro substrato orgânico e predação por protozoários.

Outra metodologia pode ser aplicada quando a comunidade microbiana do ambiente contaminado tem capacidade de degradar o poluente, mas não se pode esperar muito tempo para que os microrganismos alcancem altas densidades. Nesse caso a bioaumentação pode ser aplicada, utilizando culturas puras ou consórcios microbianos de microrganismos autóctones, o que já mostrou ser eficiente em processos de biorremediação em acidentes envolvendo derramamentos de petróleo em ambientes marinhos (105). Aparentemente, microrganismos autóctones previamente selecionados possuem maior probabilidade de sobreviver e propagar-se no ambiente após a reintrodução, quando comparados a microrganismos isolados de outros locais (120, 121).

Apesar de haver pontos que desfavoreçam a bioaumentação, existem indicativos de que essa é uma metodologia eficiente para a remoção de poluentes ambientais. A adequação dos processos, assim como a constante prospecção de microrganismos que possam ser utilizados como biodegradadores em ambientes contaminados, indicam que a bioaumentação pode emergir como uma das poucas técnicas ambientalmente corretas para se realizar a limpeza de locais contaminados (85, 100, 105).

### 1.3.2.3. Bioestimulação

Os derramamentos de petróleo representam um grande aporte de fontes de carbono para os microrganismos do local contaminado (85). A biorremediação em ambientes aquáticos é limitada pela disponibilidade de nitrogênio e fósforo, que são componentes necessários para o crescimento microbiano (120). Em casos envolvendo derramamentos de óleo, existe grande probabilidade de na água contaminada existirem bactérias capazes de metabolizar os hidrocarbonetos (40, 66, 121, 122). Embora microrganismos com tal capacidade possam estar presentes na água contaminada, seu crescimento será limitado pela alta razão C : N e C : P (11, 123). A adição de N e P na forma de fertilizantes é considerada uma forma eficaz para se estimular o crescimento e a atividade microbiana e assim proporcionar o catabolismo do óleo (99). Tal método de adição de nutrientes, assim como de aceptores de elétrons e outros compostos que proporcionem a manutenção de condições necessárias para estimular o crescimento microbiano, é denominado de bioestimulação.

Além da adição de compostos para serem utilizados no metabolismo microbiano, a modificação de condições ambientais também pode otimizar a taxa de biodegradação do óleo, por exemplo, a adição de compostos que modifiquem o pH do meio para estimular o metabolismo microbiano (40). Se comparado a ambientes terrestres, os processos de bioestimulação em ambientes marinhos devem ser adotados com maior cautela e ser melhor estudados (85). A maior preocupação é que os bioestimulantes adicionados devem entrar em contato com o microrganismos nas proximidades da mancha de óleo e, ao mesmo tempo, não devem possuir grande solubilidade em água, pois podem se dispersar no oceano e não surtir nenhum efeito desejado. Quando aplicados em locais em que a dispersão é mais lenta, deve-se tomar o cuidado para não eutrofizar o ambiente de tal forma que o acelerado crescimento de algas reduza a concentração de oxigênio dissolvido na água (124). A temperatura é um fator crucial nos processos de biodegradação, mas que não pode ser controlado em aplicações *in situ*. As variações de temperatura exercem diversos efeitos no processo de biodegradação de petróleo, à medida que afeta a viscosidade do óleo, sua solubilidade na água e sua composição química, assim como influencia nas taxas metabólicas da comunidade microbiana (36, 40).

Estima-se que, em 2010, o acidente envolvendo a plataforma da *Deepwater Horizon* foi responsável por derramar 780 milhões de litros de óleo nas águas do Golfo

do México, afetando uma área de 75 mil Km<sup>2</sup>. Depois de 7 meses de atividades de limpeza, considera-se que aproximadamente 41% do óleo evaporou, foi dissolvido ou disperso na água por condições naturais, enquanto 33% foi removido, disperso quimicamente pelo uso de surfactantes, queimado ou removido por processos de remediação, enquanto 26% permaneceram como potencial ameaça à biota local (125). Naquele evento, a fertilização foi aplicada apenas em regiões pantanosas onde a dispersão não era considerada um problema (126). Em regiões distantes da costa do Golfo do México, em razão da natureza oligotrófica da água, estudos de atividade bacteriana no entorno das manchas de óleo mostraram que a respiração microbiana aumentou em resposta à adição de nutrientes inorgânicos e o fósforo foi tido como um nutriente limitante na taxa de biodegradação do óleo. Estudos laboratoriais revelaram que o uso de flocos flutuantes de argila fertilizada, contendo nutrientes que a princípio são limitantes em águas *offshore*, poderiam ter sido utilizados para aumentar a biodegradação e conseqüentemente impedir o espalhamento do óleo (127).

Um dos problemas que inviabilizam a aplicação da bioestimulação em águas oceânicas é a alta solubilidade que os compostos adicionados possuem na água, o que reduz a sua efetividade quando adicionados em locais abertos. Atlas e Bartha (61) estudaram a efetividade de vários compostos nitrogenados oleofílicos com diferentes razões C:N. Após o acidente com derramamento de óleo envolvendo o petroleiro *Exxon Valdez*, um fertilizante oleofílico (Inipol EAP 22) foi utilizado nas regiões próximas à costa (38, 128), porém alguns relatórios (129, 130) que afirmavam a eficácia do processo foram contestados (131).

O ácido úrico é um composto rico em nitrogênio e apresenta baixa solubilidade em água. Nos experimentos de Koren *et al.* (122), o ácido úrico foi utilizado como fertilizante nitrogenado e seus resultados indicaram que ele serve como fonte de nitrogênio para bactérias que degradam hidrocarbonetos e que ele se liga ao óleo cru, tornando-se um fertilizante potencialmente útil para ser aplicado em processos de biorremediação de petróleo em sistemas abertos, visto que sua molécula pode permanecer adsorvida ao óleo.

O uso de compostos fontes de N e P juntamente com biossurfactantes permite que microrganismos de ocorrência natural no ambiente se adaptem melhor e de forma mais rápida à presença do contaminante, garantindo que as taxas de degradação sejam mais rápidas. Outra combinação possível é a utilização de bioaugmentação, bioestimulação e adição de biossurfactantes, dependendo das características bióticas e

abióticas do meio e das características físico-químicas do contaminante (132). O desenvolvimento dos microrganismos autóctones após a adição de bioestimulantes em um ambiente contaminado é lento (105). Portanto, levando-se em consideração as limitações da aplicação individual tanto das metodologias de bioaugmentação quanto de bioestimulação, é interessante que haja complementação entre elas para que ocorra maior efetividade no processo de descontaminação. A complexidade de cada ambiente dificulta a padronização de uma metodologia de biorremediação única. Portanto, a seleção de microrganismos de interesse para cada local contaminado provavelmente figura como uma das melhores opções (84).

#### 1.4. REFERÊNCIAS

1. **Brown DW, Ramos SL, Friedman AJ, MacLeod WDJ.** 1979. Analysis of trace levels of petroleum hydrocarbons in marine sediments using a solvent/slurry extraction procedure, p. 161–167. *In* Hertz, HS, Chesler, SN (eds.), Trace organic analysis: a new frontier in analytical chemistry, 9th ed. Washington, D.C.
2. **Speight JG.** 2007. The Chemistry and Technology of Petroleum, 4th ed. CRC Press, New York.
3. **Halliburton AD.** 2001. Basic Petroleum Geology and Log Analysis. Halliburton Company.
4. **Bentley RW.** 2002. Global oil & gas depletion : an overview. Energy Policy **30**:189–205.
5. **Aguilera RF, Eggert RG, Lagos C.C. G, Tilton JE.** 2009. Depletion and the Future Availability of Petroleum Resources. Energy J. **30**.
6. **Stone RW, ZoBell CE.** 1952. Bacterial Aspects of the Origin of Petroleum. Ind. Eng. Chem. **44**:2564–2567.
7. **Welte DH, Yokler A.** 1980. Evolution of sedimentary basins from the standpoint of petroleum origin and accumulation—A approach for a quantitative basin study. Organic Geochemistry **2**:1-8.
8. **Kissin Y.** 1987. Catagenesis and composition of petroleum: Origin of n-alkanes and isoalkanes in petroleum crudes. Geochim. Cosmochim. Acta **51**:2445–2457.
9. **Tissot BP, Welte DH.** 1984. Diagenesis, Catagenesis and Metagenesis of Organic Matter, p. 69–73. *In* Petroleum Formation and Occurrence, 1st ed. Springer-Verlag, New York.

10. **Martinelli G.** 2009. Petroleum Geochemistry Petroleum Engineering – Upstream. UNESCO - EOLSS.
11. 2012. Indústria Nacional do Petróleo e do Gás Natural, p. 1–17. *In* Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP.
12. 2011. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP.
13. **Altkins PW.** 2001. Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Artmed, Porto Alegre, RS.
14. **Sharkey TD.** 1996. Isoprene synthesis by plants and animals. *Endeavour* **20**:74–8.
15. **William D, McCain Jr.** 1990. Components of Naturally Occurring Petroleum Fluids. *In* The properties of petroleum fluids. PennWell Books.
16. **Evans SR, Rice SD.** 1974. Effects of oil on marine ecosystems: a review for administrators and policy makers. *Fish. Bull.* 72:625-638.
17. **Gerlach SA.** 1981. Marine pollution: diagnosis and therapy *Marine pollution bulletin.* Springer-Verlag.
18. **Milanelli JCC.** 1994. Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento de um costão rochoso da Praia de Barequeçaba, São Sebastião, São Paulo. Universidade de São Paulo.
19. **Morrison RT.** 1985. Química Organica, 2nd ed. San Marcos.
20. **Laws EA.** 1993. Aquatic pollution. An introductory text. USA, An Interscience Publication.
21. **Zílio EL, Pinto UB.** 2002. Identification and distribution of the main groups of components present in brazilian crude oils. *Boletins Técnicos da PETROBRAS.* **45**:21-25. Atuação no pré-sal.
22. **Petrobras. 2012.** Atuação no Pré-Sal. <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/presal/>.
23. **Agência Nacional do Petróleo - ANP.** 2011. Seção 2 – Indústria nacional do petróleo e do gás natural, *In* Anuário estatístico 2011. <http://www.anp.gov.br/?pg=58071>
24. **Kingston PF.** 2002. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. *Spill Sci. Technol. Bull.* **7**:53–61.

25. **Gundlach ER, Hayes MO.** 1978. Vulnerability of coastal environments to oil spill impacts. *Mar. Technol. Soc. J.* **12**:18–27.
26. **Silva EM, Peso-Aguiar MC, Navarro MFT, Barros C, Chastinet A.** 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* **16**:112–118.
27. **Fay JA.** 1971. Physical Processes in the Spread of Oil on a Water Surface. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* 463–467.
28. **Blumer M, Sanders HL, Grassle JF, Hampson GR.** 1971. An oceanic oil spill: A small oil spill. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development.* **13**:37-41.
29. **Haritash AK, Kaushik CP.** 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* **169**:1–15.
30. **Sabaté J, Bayona JM, Solanas M.** 2001. Photolysis of PAHs in aqueous phase by UV irradiation. *Chemosphere* **44**:119–24.
31. **Eastcott L, Shiu WY, Mackay D.** 1988. Environmentally Relevant Physical-Chemical Properties of Hydrocarbons : A Review of Data and Development of Simple Correlations. *Oil Chem. Pollut.* **4**:191–216.
32. **Shiu WY, Bobra M, Bobra AM, Maijanen A, Suntio L, Mackay D.** 1990. The water solubility of crude oils and petroleum products. *Oil Chem. Pollut.* **7**:57–84.
33. **Bridié AL, H. WT, W. Z, Van Der Heijde HB.** 1980. Formation , Prevention and Breaking of Sea Water in Crude Oil Emulsions “Chocolate Mousses”. *Mar. Pollut. Bull.* **11**:343–348.
34. **Thingstad T, Pengerud B.** 1982. The Formation of “Chocolate Mousse” from Staffjord Crude Oil and Seawater. *Mar. Pollut. Bull.* **14**:214–216.
35. **Fingas M, Fieldhouse B.** 2004. Formation of water-in-oil emulsions and application to oil spill modelling. *J. Hazard. Mater.* **107**:37–50.
36. **Aske N, Kallevik H, Sjöblom J.** 2002. Water-in-crude oil emulsion stability studied by critical electric field measurements . Correlation to physico-chemical parameters and near-infrared spectroscopy. *J. Pet. Sci. Eng.* **36**:1–17.
37. **Cury JDEC.** 2002. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Universidade de São Paulo.
38. **Atlas RM.** 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation Oil Spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **52**:149–156.
39. **Miller RM, Singer GM, Rosen JD, Bartha R.** 1988. Photolysis and biodegradation of benzo[a]pyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1724–30.

40. **Brooks JM, Bernard BB, Sauer TC, Abdel-Reheim H.** 1978. Environmental Aspects of a Well Blowout in the Gulf of Mexico James. Am. Chem. Soc. **12**:695–703.
41. **Leahy JG, Colwell RR.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. **54**:305–15.
42. **Ghazali FM, Rahman RNZA, Salleh AB, Basri M.** 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. Int. Biodeterior. Biodegradation **54**:61–67.
44. **Atlas RM.** 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiol. Rev. **45**:180–209.
45. **Colwell RR, Walker JD.** 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. Crit. Rev. Microbiol. 423–445.
46. **Cerniglia CE.** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. **4**:331–338.
45. **Samanta SK, Singh O V, Jain RK.** 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnol. **20**:243–8.
46. **Ruberto L, Vazquez SC, Mac Cormack WP.** 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. Int. Biodeterior. Biodegradation **52**:115–125.
47. **Hamme JD Van, Singh A, Ward OP.** 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **67**:503-549.
48. **Haritash AK., Kaushik CP.** 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials, **169**:1-15.
49. **Beal R, Betts WB.** 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol. **89**:158–68.
50. **Mulligan CN.** 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut. **133**:183–98.
51. **Bordoloi NK, Konwar BK.** 2009. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. J. Hazard. Mater. **170**:495–505.
52. **Das N, Chandran P.** 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. Biotechnol. Res. Int. **2011**:941810.

53. **Nedwell D.** 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:101–111.
54. **Coulon F, Pelletier E, Gourhant L, Delille D.** 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere* **58**:1439–48.
55. **Eriksson M, Sodersten E, Yu Z, Dalhammar G, Mohn WW.** 2003. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:275–284.
56. **Brakstad OG, Bonaunet K.** 2006. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 degrees C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation* **17**:71–82.
57. **Mateles RI, Baruah JN, R. TS.** 1967. Growth of a Thermophilic Bacterium on Hydrocarbons: A New Source of Single-Cell Protein. *Science (80-. )*. **157**:1322–1323.
58. **Moore MAS, Owen JJT.** 1967. Thermophilic Bacterium isolated on n-Tetradecane. *Nature* **215**:1082–1083.
59. **Acevedo GT De, McInerney MJ.** 1996. Emulsifying activity in thermophilic and extremely thermophilic microorganisms. *J. Ind. Microbiol.* **16**:1–7.
60. **Perry JJ.** 1979. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **43**:59–72.
61. **Sarkar D, Ferguson M, Datta R, Birnbaum S.** 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environ. Pollut.* **136**:187–95.
62. **Atlas RM, Bartha R.** 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.* **7**:538–41.
63. **Floodgate GD.** 1995. Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. *Aquat. Microb. Ecol.* **9**:3–11.
64. **Widada HN, Kasuga K, Yo TJ.** 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:202–209.
65. **Rodrigues DF, Sakata SK, Comasseto J V, Bicego MC, Pellizari VH.** 2009. Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. *J. Appl. Microbiol.* **106**:1304–14.

66. **Kostka JE, Prakash O, Overholt W a, Green SJ, Freyer G, Canion A, Delgardio J, Norton N, Hazen TC, Huettel M.** 2011. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:7962–74.
67. **Habe H, Omori T.** 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**:225–43.
68. **Whitehead A.** 2013. Interactions between oil-spill pollutants and natural stressors can compound ecotoxicological effects. *Integr. Comp. Biol.* **53**:635–47.
69. **Ramachandran SD, Hodson P V, Khan CW, Lee K.** 2004. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**:300–8.
70. **McCay DF, Rowe JJ, Whittier N, Sankaranarayanan S, Etkin DS.** 2004. Estimation of potential impacts and natural resource damages of oil. *J. Hazard. Mater.* **107**:11–25.
71. **GESAMP.** 1993. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Reports and Studies, n° 50, London.
72. **Ritter, Keith Solomon, Paul Sibley, L.** 2002. Sources, Pathways, and Relative Risks of Contaminants in Surface Water and Groundwater: a Perspective Prepared for the Walkerton Inquiry *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.*
73. **La Rocca C, Conti L, Crebelli R, Crochi B, Iacovella N, Rodriguez F, Turrio-Baldassarri L, di Domenico a.** 1996. PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **33**:236–45.
74. **Chen G, White PA.** 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutat. Res.* **567**:151–225.
75. **Shimada T, Fujii-Kuriyama Y.** 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* **95**:1–6.
76. **Bartha R.** 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* **12**:155–172.
77. **Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE, Survey USG, Federal D.** 1998. Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments. *Environ. Sci. Technol.* **32**:264–269.
78. **Simpson CD, Mosi AA, Cullen WR, Reimer KJ.** 1996. Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada. *Sci. Total Environ.* **181**:265–78.

79. **Reynaud S, Deschaux P.** 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* **77**:229–238.
80. **Carls MG, Babcock MM, Harris PM, Irvine G V, Cusick JA, Rice SD.** 2001. Persistence of oiling in mussel beds after the Exxon Valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.* **51**:167–90.
81. **Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE, Irons DB.** 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* **302**:2082–6.
82. **Alonso-Alvarez C, Pérez C, Velando A.** 2007. Effects of acute exposure to heavy fuel oil from the Prestige spill on a seabird. *Aquat. Toxicol.* **84**:103–10.
83. **Peterson.** 2001. The “Exxon Valdez” Oil Spill in Alaska : Acute , Indirect and Chronic Effects on the Ecosystem. *Adv. Mar. Biol.* **39**:1–103.
84. **Engelhardt FR.** 1983. Petroleum effects on marine mammals. *Aquat. Toxicol.* **4**:199–217.
85. **Tyagi M, da Fonseca MMR, de Carvalho CCCR.** 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* **22**:231–41.
86. **Bao M-T, Wang L-N, Sun P-Y, Cao L-X, Zou J, Li Y-M.** 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **64**:1177–1185.
87. **Khan FI, Husain T, Hejazi R.** 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* **71**:95–122.
88. **Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:63–70.
89. **Murado M a, Vázquez J a, Rial D, Beiras R.** 2011. Dose-response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. *J. Hazard. Mater.* **185**:807–17.
90. **Beiras EHR, Seaman MNL, France A.** 1999. The Assessment of Marine Pollution . Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae.
91. **Fucik KW, Carr KA.** 1994. Dispersed Oil Toxicity Tests with Biological Species Indigenous to the Gulf of Mexico Dispersed Oil Toxicity Tests with Biological Species Indigenous to the Gulf of Mexico. U.S . Department of the Interior, New Orleans.
92. **Gundersen DT, Kristanto SW, Curtis LR, N. A-YS, M. MM, Al-Ajmi D.** 1996. Subacute Toxicity of the Water-Soluble Fractions of Kuwait Crude Oil and Partially Combusted Crude Oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **8**:1–8.

93. **Blenkinsopp SA, Sergy G, Wohlgeschaffent KDOEG, Li K.** 1997. Toxicity of the Weathered Crude Oil Used at the Newfoundland Offshore Burn Experiment (NOBE) and the Resultant Burn Residue. *Spill Sci. Technol. Bull.* **3**:277–280.
94. **Wolfe MF, Schwartz GJB, Singaram S, Mielbrecht EE.** 1999. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of phenanthrene to algae and rotifers. *Aquat. Toxicol.* **48**:13–24.
95. **Zhu X, Venosa AD, Suidan MT, Lee K.** 2001. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.
96. **Cantagallo CAC, Ilanelli JOÃOCACM, Rito DIDIAS.** 2007. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petr3leo : uma revis3o. *Panam. J. Aquat. Sci.* **2**:1–12.
97. **Patrick A, Craig DL, Sena E, Magalh3es L, Canelas M.** 2012. T3cnicas de limpeza de vazamentos de petr3leo em alto mar. *Cad. Grad. - Ci3ncias Exatas e Tecnol3gicas* **1**:75–86.
98. **Lessard RR, Demarco G.** 2000. The Significance of Oil Spill Dispersants. *Spill Sci. Technol. Bull.* **6**:59–68.
99. **Atlas RM, Hazen TC.** 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. *Environ. Sci. Technol.* **45**:6709–15.
100. **El Fantroussi S, Agathos SN.** 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:268–75.
101. **Yu KSH, Wong a HY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY.** 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **51**:1071–7.
102. **Iwamoto T, Nasu M.** 2001. Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:1–8.
103. **Xia WX, Li JC, Zheng XL, Bi XJ, Shao JL.** 2006. Enhanced Biodegradation of Diesel Oil in Seawater Supplemented with Nutrients. *Eng. Life Sci.* **6**:80–85.
104. **Zahed MA, Aziz HA, Isa MH, Mohajeri L.** 2010. Enhancement Biodegradation of n-alkanes from Crude Oil Contaminated Seawater. *Int. J. Environ. Res.* **4**:655–664.
105. **Nikolopoulou M, Eickenbusch P, Pasadakis N, Venieri D, Kalogerakis N.** 2013. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills. *N. Biotechnol.* **00**:1–9.
106. 1994. Alternatives for Ground Water Cleanup. NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington, D.C.

107. **Pezeshki SR, Hester MW, Lin Q, Nyman JA.** 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ. Pollut.* **108**:129–139.
108. **Hambrick G a, Delaune RD, Patrick WH.** 1980. Effect of Estuarine Sediment pH and Oxidation-Reduction Potential on Microbial Hydrocarbon Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:365–9.
109. **Atlas RM.** 1995. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **31**:178–182.
110. **Krumbolz LR, Caldwell ME, Suflita JM.** 1996. Biodegradation of “BTEX” hydrocarbons under anaerobic conditions, p. 61–99. *In* Crawford, RL, Crawford, DL (eds.), *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge University Press, New York.
111. **Táncsics A, Szoboszlay S, Szabó I, Farkas M, Kovács B, Kukolya J, Mayer Z, Kriszt B.** 2012. Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environ. Sci. Technol.* **46**:232–40.
112. **Gallego JR, González-Rojas E, Peláez a. I, Sánchez J, García-Martínez MJ, Ortiz JE, Torres T, Llamas JF.** 2006. Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Org. Geochem.* **37**:1869–1884.
113. **McKew B a, Coulon F, Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Smith CJ, Osborn a M, Timmis KN, McGenity TJ.** 2007. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ. Microbiol.* **9**:1562–71.
114. **Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM.** 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* **85**:257–61.
115. **Nyer EK, Pauyne F, Sutherson S.** 2003. Discussion od environment vs. bacteria or let’s play “Name tha Bacteria”. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:36–45.
116. **Roane TM, Josephson KL, Pepper IL.** 2001. Dual-Bioaugmentation Strategy To Enhance Remediation of Cocontaminated Soil Dual-Bioaugmentation Strategy To Enhance Remediation of Cocontaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3208–3215.
117. **Van Veen J a, van Overbeek LS, van Elsas JD.** 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:121–35.
118. **Gentry T, Rensing C, Pepper I.** 2004. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **34**:447–494.

119. **Goldstein RM, Mallory LM, Alexander M.** 1985. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:977–83.
120. **Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM.** 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.* **102**:772–8.
121. **Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, Knittel K, Ramette A, Reitz A, Samarkin V, Treude T, Boetius A.** 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **57**:2008–2021.
122. **Koren O, Knezevic V, Ron EZ, Rosenberg E.** 2003. Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6337–6339.
123. **Venosa AD, Campo P, Suidan MT.** 2010. Biodegradability of lingering crude oil 19 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.* **44**:7613–21.
124. **Nikolopoulou M, Kalogerakis N.** 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**:802–807.
125. 2010. Oil Budget Calculator - Deepwater Horizon.
126. **Tate PT, Shin WS, Pardue JH, Jackson WA.** 2011. Bioremediation of an Experimental Oil Spill in a Coastal Louisiana Salt Marsh. *Water, Air, Soil Pollut.* **223**:1115–1123.
127. **Edwards BR, Reddy CM, Camilli R, Carmichael C a, Longnecker K, Van Mooy B a S.** 2011. Rapid microbial respiration of oil from the Deepwater Horizon spill in offshore surface waters of the Gulf of Mexico. *Environ. Res. Lett.* **6**:035301.
128. **Lindstrom JE, Prince RC, Clark JC, Grossman MJ, Yeager TR, Braddock JF, Brown EJ.** 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2514–22.
129. **Crawford M.** 1990. Bacteria effective in Alaska cleanup. *Science* **247**:1537.
130. **Pritchard PH, Mueller JG, Rogers JC, Kremer F V., Glaser J a.** 1992. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. *Biodegradation* **3**:315–335.
131. **Button DK, Robertson BR, McIntosh D, Jüttner F.** 1992. Interactions between marine bacteria and dissolved-phase and beached hydrocarbons after the Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:243–51.

132. **Nikolopoulou M, Kalogerakis N.** 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar. Pollut. Bull.* **56**:1855–61.

## **CAPÍTULO 2**

### **PROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS QUANTO AO POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO NO LITORAL DA ILHA DA TRINDADE**

#### **RESUMO**

Um experimento foi conduzido no litoral da Ilha da Trindade, onde uma delgada camada de petróleo foi inserida na superfície de cupons de acrílico. Esses cupons foram deixados no ambiente por 60 dias e permitiram a obtenção de quinze isolados bacterianos provenientes do biofilme formado na superfície do óleo. O isolamento foi realizado com meios de enriquecimento, utilizando naftaleno e hexadecano como únicas fontes de carbono e energia. A capacidade desses isolados de utilizarem diferentes hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia foi investigada. Nenhum dos isolados produziu biossurfactantes nas condições experimentais avaliadas. Foram utilizados métodos de identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA e por análise do perfil de ácidos graxos (MIDI). Dentre os quinze isolados, foram obtidos representantes de Actinobacteria, Alfabroteobacteria e Firmicutes. Os isolados *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 foram capazes de utilizar todos os diferentes hidrocarbonetos adicionados aos meios de cultura. Amplificação por PCR do DNA dos isolados empregando-se primers para os genes *alkB*, *PAH-RHD $\alpha$*  e *C23DO* demonstrou que vários isolados capazes de utilizar hidrocarbonetos não apresentam os genes de rotas conhecidas de catabolismo, sugerindo a existência de novas vias catabólicas ainda desconhecidas nesses microrganismos. Os resultados com os dois isolados destacados revelam o potencial dessas bactérias serem utilizadas em processos de biorremediação de ambientes contaminados com petróleo.

#### **2.1. INTRODUÇÃO**

Acidentes envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados em ecossistemas marinhos normalmente causam a contaminação de uma extensa área, em razão dos grandes volumes de óleo estocados ou transportados (1). O crescimento da preocupação com problemas ambientais de grandes magnitudes leva ao aumento da

demanda por formas de prevenção e mitigação de impactos ambientais que possam ocorrer (1, 2).

Hidrocarbonetos provenientes do petróleo acidentalmente liberados no ambiente causam distúrbios ambientais severos, ocasionando prejuízos para a biota e para a economia do local atingido (3). Os efeitos são sentidos imediatamente e também em longo prazo. Em ambientes costeiros, os problemas do contato do óleo com a biota são visualizados ao ocorrer incrustação em rochas, areia, animais e plantas, causando diminuição na capacidade respiratória e fotossintética dos organismos, ocasionando mortandades em massa (4). Os hidrocarbonetos de baixa massa molecular possuem solubilidade em água relativamente alta, tornando-os biodisponíveis (5). Esses compostos podem causar o rompimento da membrana citoplasmática de microrganismos com potencial de degradá-los (6) e, ainda, intoxicar plantas e animais (7).

Os hidrocarbonetos de maior peso molecular e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são causadores de efeitos tóxicos sentidos em longo prazo. Moléculas que possuem anéis aromáticos condensados e ramificações são de baixa solubilidade e causam efeitos tóxicos crônicos no ambiente, pois são recalcitrantes e de difícil volatilização (8, 9, 10). Os PAH podem ser adsorvidos a materiais particulados em suspensão na água e conseqüentemente depositados no sedimento, que torna-se um reservatório de contaminantes, exercendo efeitos ecotoxicológicos na biota marinha por um longo período (11, 12). Alguns PAHs podem causar danos no DNA e assim induzir mutações e exercer efeitos carcinogênicos. Além disso, podem interferir nas taxas de crescimento, sucesso reprodutivo, no aumento da sensibilidade a patógenos e ocasionar danos ao sistema imunológico de animais (4).

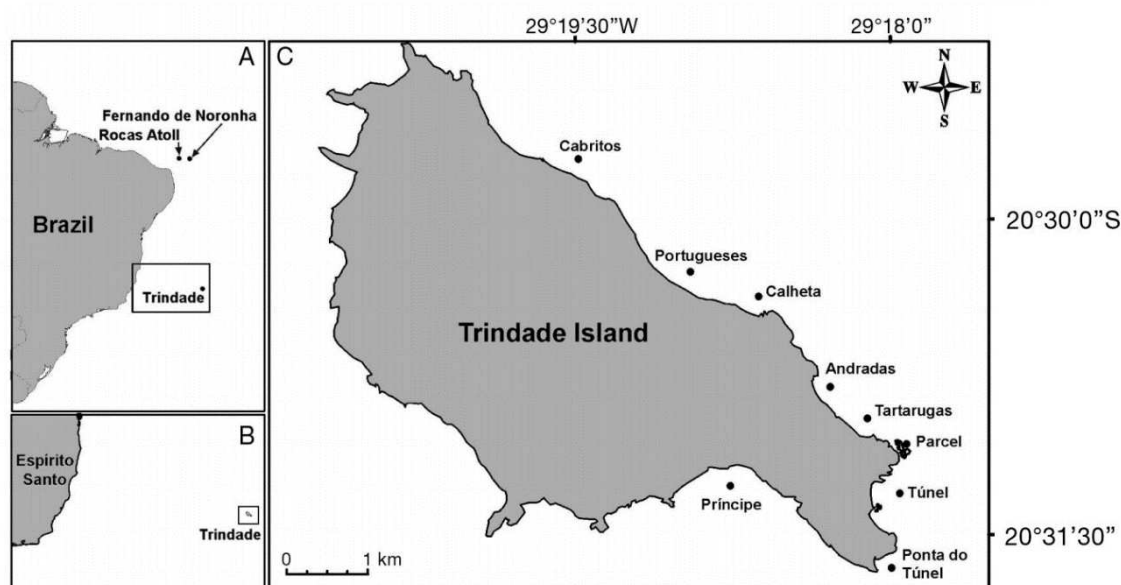
A biorremediação tem sido considerada um método biológico eficaz para se realizar a descontaminação de ambientes contaminados, pois apresenta custos relativamente baixos e pode proporcionar a eliminação de contaminantes do ambiente, enquanto que métodos físicos e químicos geralmente causam a dispersão do contaminante e não sua efetiva remoção, tornando sua eficácia limitada e de custo elevado (13, 14). A biorremediação de locais contaminados depende das capacidades metabólicas dos microrganismos autóctones, assim como das condições ambientais (15). Uma alternativa para se aumentar a eficiência dos processos de biorremediação consiste na prospecção de microrganismos que possuam a capacidade de degradar um contaminante ou classe de contaminantes existente no próprio ambiente a ser

remediado. Em caso de ocorrência de contaminação, esses microrganismos podem ser multiplicados em laboratório e então inoculados no ambiente, em um processo denominado bioaugmentação. Por serem autóctones, esses microrganismos já são adaptados a algumas das variáveis ambientais do local contaminado e, aparentemente, as células permanecem viáveis por maior tempo se comparadas com microrganismos selecionados de outros ambientes (16, 17).

O presente estudo objetivou prospectar, isolar e caracterizar microrganismos com capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo na área costeira da Ilha da Trindade - Brasil, onde não existem registros de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo oriundos de derramamentos ou vazamentos. Avaliou-se a capacidade de crescimento das bactérias isoladas em meios contendo diferentes hidrocarbonetos como únicas fontes de carbono e energia, a produção de biosurfactantes e a presença de alguns genes envolvidos no catabolismo de hidrocarbonetos do petróleo.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.2.1. Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras.** Os procedimentos para a prospecção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foram realizados na costa da Ilha da Trindade – Brasil, uma ilha oceânica distante aproximadamente 1140 km da costa da cidade de Vitória, ES – Brasil (situada entre os paralelos de 20° 29' e 20° 32' S e os meridianos de 29° 17' e 29° 21' W, Fig. 1).



**Figura 1.** Localização geográfica da Ilha da Trindade. A e B. Ilha da Trindade em relação à costa do Brasil; C. Mapa da Ilha da Trindade, com nome de algumas das principais praias do local. Adaptada de Almeida et al., 2011 (18).

Uma haste de alumínio de 1,5 m de comprimento, contendo cinco placas de acrílico (4 cm x 3 cm) pinceladas com uma delgada camada de petróleo foi presa a uma bóia fixa a aproximadamente 100 m da Praia das Tartarugas. O petróleo utilizado foi previamente aquecido gradativamente até 210 °C, para a perda dos compostos mais voláteis. O material foi mantido em 30 cm de profundidade na água por 60 dias e as placas contendo petróleo foram recolhidas e imediatamente armazenadas em tubos do tipo Falcon estéreis e preservadas a 4,0 °C.

**2.2.2. Enriquecimento e Isolamento de Bactérias Degradadoras de Hidrocarbonetos.** O meio mineral Bushnell Hass (BH) - HIMEDIA® foi utilizado como meio basal para o enriquecimento e isolamento, contendo (por litro): 0,20 g de MgSO<sub>4</sub>, 0,020 g de CaCl<sub>2</sub>, 1,00 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,00 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,00 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 0,05 g de FeCl<sub>3</sub>. Após a solidificação dos meios em placas de Petri descartáveis de 90 mm, foram utilizados hexadecano ou naftaleno como únicas fontes de carbono e energia. Antes de se realizar a inoculação das amostras, 70 µL de hexadecano foram espalhados na superfície do ágar com auxílio de uma alça de Drigalsky. Nas placas onde o naftaleno foi a única fonte de carbono, cristais de naftaleno foram colocados na parte interna das tampas das placas de Petri após a inoculação. Para o preparo das amostras, foi realizada uma leve raspagem na superfície do óleo contido nas placas de acrílico que serviram como “armadilha”. O conteúdo obtido foi diluído de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> em solução salina (NaCl 0,9 % p/v). Um volume de 20 µL de cada diluição foi adicionado e espalhado nas placas contendo hexadecano ou naftaleno como únicas fontes de carbono. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 72 h.

**2.2.3. Extração de DNA.** Após o isolamento, os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente (© Merck KGaA) sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 48 h. Para realizar a extração de DNA, foi coletado 1 mL das culturas e o volume inserido em tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 15.000 x g por 2 minutos, lavados duas vezes com água estéril e finalmente ressuspendidos em 100 µL da mesma água. A seguir, os tubos foram mantidos em banho maria a 97 °C por 10 minutos. Os conteúdos foram então centrifugados a 15.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado em novos tubos estéreis. A integridade do DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 % (p/v) e a concentração foi determinada pelo método de Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™).

**2.2.4. Sequenciamento Parcial do Gene 16S rRNA e Análises Filogenéticas por MIDI.** As amostras de DNA foram amplificadas com 0,4 µM dos *primers*

universais 005F (5' - TGG AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e 531R (5' - TAC CGC GGC TGC TGG CAC - 3'). A PCR (100  $\mu$ L) continha 80 ng de DNA bacteriano, 20  $\mu$ L de 5x Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), concentração de 0,2 mM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* Polimerase (Promega). A reação de amplificação consistiu de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55 °C por 60 s, e 72 °C por 60 s, com extensão final a 72 °C por 10 min em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf®). Os produtos de PCR amplificados foram sequenciados em um equipamento MegaBace 1000 Sequencing System (GE Healthcare). As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

O procedimento para a identificação dos isolados através do Microbial Identification System (MIDI) (Microbial ID Inc., Newark, Del) foi realizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (19). A obtenção do perfil dos ácidos graxos de membrana foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama 7890A (Agilent Technologies, Inc) e as análises dos picos obtidos foram realizadas com uso do software Sherlock® Microbial Identification System. Os perfis de ácidos graxos foram utilizados para gerar uma análise de agrupamento, utilizando-se o mesmo software.

**2.2.5. Análise da Presença de Genes de Vias do Catabolismo de Hidrocarbonetos.** A análise da presença de genes que codificam enzimas que atuam no catabolismo de hidrocarbonetos foi realizada por meio de PCR, utilizando-se três pares de *primers* (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenvolvidos para amplificar regiões dos genes que codificam as enzimas Catechol 2,3-Dioxigenase (C23DO), Alcano Desidrogenase (*alkB*) e a subunidade alpha de Dioxigenases de hidroxilação de anéis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH-RHD $\alpha$ ). Os isolados 97, 75 e 58 do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente da Universidade Federal de Viçosa foram utilizados como controles positivos nas reações com PAH-RHD $\alpha$ , C23DO e *alkB*, respectivamente.

**Tabela 1.** Relação de *primers* a serem utilizados nas reações de PCR com o DNA genômico extraído dos isolados da Ilha da Trindade.

<i>Primer</i>	Tamanho do Amplicon	Especificidade	Sequência (5' – 3')	Referência
ST5-F	149 bp	C23DO	GTG GGC ACA GAG GTC GGC	(20)
ST5-R			AAG AAC TTG GTG TTC TCG GC	
AlkBF	~100bp	alkB	AAC TAC ATC GAG CACTAC GG	(21)
AlkBR			TGA AGA TGT GGT TGCTGT TCC	
PAH-RHD $\alpha$ -396F	~320bp	PAH-	ATT GCG CTT AYC AYG GBT GG	(22)
PAH-RHD $\alpha$ -696R		RHD $\alpha$	ATA GGT GTC TCC AAC RAA RTT	

**2.2.6. Detecção da Produção de Biossurfactantes.** Três metodologias foram utilizadas para a análise da produção de biossurfactantes pelos isolados obtidos. Primeiramente, foram confeccionadas placas contendo ágar nutriente ou ágar BH adicionadas de naftaleno ou hexadecano como únicas fontes de carbono e de 5,0 % de sangue de carneiro desfibrinado. Cada isolado foi estriado nas placas e a incubação ocorreu por 96 h a 30 °C. As placas foram visualmente inspecionadas na busca por zonas de hemólise ao redor das colônias, indicativas da produção de biossurfactantes (23). A segunda metodologia utilizada foi a do colapso da gota. Para isso, os isolados foram cultivados por 24 h a 30 °C em agitação de 200 rpm em meio contendo (por litro): 13,9 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,10 g de extrato de levedura, 1,0 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5,0 g de glicose, adicionado de 50 mL de uma solução de elementos-traço contendo (por litro): 0,50 g de EDTA, 0,10 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,50 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,10 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,10 g de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,10 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,010 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,010 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 3,0 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 1,0 g de NaCl. 2,0 µL de óleo mineral foram adicionados em 15 poços da tampa de uma microplaca de 96 poços. A tampa foi equilibrada por 1 h a temperatura ambiente. Uma alíquota de 1,0 mL de cada isolado cultivado foi centrifugada por 16.000 x g por 2 minutos. Em seguida, 5 µL do sobrenadante foram adicionados à superfície do óleo (24). A morfologia da gota foi observada depois de um minuto. A produção de biossurfactantes foi caracterizada pelo espalhamento da fase aquosa sobre a superfície do óleo. A terceira metodologia foi a de espalhamento de óleo em superfície aquosa. Para tanto, 100 mL de água destilada foram adicionados em uma placa de Petri (25 cm de diâmetro) e 20 µL de óleo cru

foram adicionados na superfície da água, no centro da placa. Após o espalhamento uniforme do óleo na superfície da água, 10 µL da cultura de cada isolado (descrita acima) foram adicionados no centro da mancha de óleo. A presença de biossurfactantes foi evidenciada pelo surgimento de um círculo límpido no interior da mancha de óleo.

#### **2.2.7. Ensaio de Crescimento em Meios de Cultivo com Hidrocarbonetos.**

Os isolados obtidos foram cultivados em caldo nutriente (© Merck KGaA) sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 48 h. Foi realizada centrifugação a 15.000 x g por 2 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em água estéril por duas vezes. Após esses passos, as células foram adicionadas aos tubos de ensaio contendo o meio BH adicionado da fonte de carbono sob avaliação. Cada tubo de ensaio continha apenas um hidrocarboneto como fonte de carbono, em uma concentração final de 0,5 % (p/v). Os hidrocarbonetos avaliados foram Tolueno, Octano, Xileno, Naftaleno, Fenantreno, Pireno, Hexadecano, Antraceno, Eicosano, Tetracosano, Triacotano ou Pentacontano. Os tubos foram incubados sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 15 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

### **2.3. RESULTADOS**

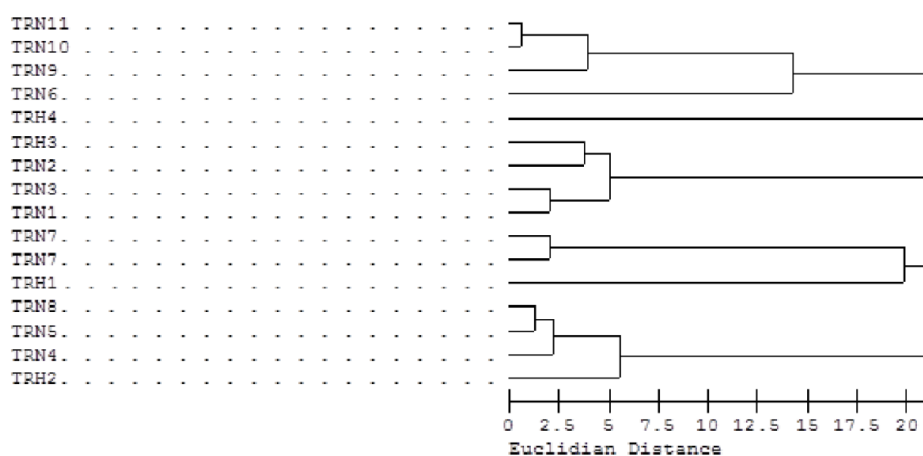
**2.3.1. Isolamento e Identificação Taxonômica.** O enriquecimento da amostra coletada nos cupons de acrílico pincelados com petróleo em meio mineral contendo naftaleno e hexadecano como únicas fontes de carbono resultou na obtenção de 15 isolados bacterianos, sendo que 11 deles foram obtidas do meio com naftaleno como única fonte de carbono e os outros 4 do meio com hexadecano. Os resultados das identificações pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e pelo perfil de ácidos graxos podem ser visualizados na tabela 2. Por MIDI, não foi possível identificar oito dos isolados, pois os perfis cromatográficos dos ácidos graxos destas oito linhagens não foram similares aos disponíveis na biblioteca ITSA1 (Instant Environmental TSA library version 1.10). Dentre os quinze isolados, seis foram identificados como pertencentes ao filo Actinobacteria, quatro ao filo Proteobacteria, todos do gênero *Tistrella* e cinco ao filo Firmicutes.

**Tabela 2.** Identificação dos isolados pelas metodologias Sherlock® Microbial Identification System (MIDI) e pela análise do gene parcial 16S rRNA, com o índice de similaridade (SI) e identidade da sequência (ID), respectivamente, de seus bancos de dados.

Isolado	MIDI		16S	
	Identificação	SI	Identificação	ID
TRH1	<i>Nocardia farcinica</i>	0,650	<i>Gordonia sp.</i>	99 %
TRH2	Não Identificado	---	<i>Tistrella sp.</i>	94 %
TRH3	Não Identificado	---	<i>Exiguobacterium sp.</i>	95 %
TRH4	Cellulosimicrobium cellulans – GC subgroup B	0,690	<i>Cellulosimicrobium sp.</i>	99 %
TRN1	Não Identificado	---	<i>Exiguobacterium sp.</i>	96 %
TRN2	Não Identificado	---	<i>Exiguobacterium sp.</i>	99 %
TRN3	Não Identificado	---	<i>Exiguobacterium sp.</i>	98 %
TRN4	Não Identificado	---	<i>Tistrella sp.</i>	99 %
TRN5	Não Identificado	---	<i>Tistrella sp.</i>	98 %
TRN6	<i>Microbacterium lacticum</i>	0,843	<i>Microbacterium sp.</i>	95 %
TRN7	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	0,602	<i>Rhodococcus sp.</i>	98 %
TRN8	Não Identificado	---	<i>Tistrella sp.</i>	95 %
TRN9	<i>Microbacterium terrae</i>	0,510	<i>Microbacterium sp.</i>	99 %
TRN10	<i>Microbacterium terrae</i>	0,742	<i>Microbacterium sp.</i>	88 %
TRN11	<i>Microbacterium terrae</i>	0,726	<i>Microbacterium sp.</i>	94 %

Não foi possível identificar os isolados TRH2, TRH3, TRN1, TRN2, TRN3, TRN4, TRN5 e TRN8 pelo perfil de ácidos graxos, sendo que a similaridade das sequências de 16S rRNA desses isolados com as depositadas no GenBank foram de 94%, 95 %, 96 %, 99 %, 98 %, 99%, 98% e 95%, respectivamente. Na figura 2 é mostrado o dendrograma com as distâncias euclidianas dos perfis de ácidos graxos dos isolados gerados pelo sistema MIDI. De acordo com o agrupamento, consideram ser

pertencentes a um mesmo isolado (distância euclidiana < 2,5) os de número TRN10 e TRN11; TRN1 e TRN3; TRN4, TRN5 e TRN8.



**Figura 2.** Dendrograma da Distância Euclidiana obtido através da identificação pelo Microbial Identification System (MIDI) com base nos resultados cromatográficos do perfil de ácidos graxos de membrana dos isolados.

**2.3.2. Presença de Genes de Vias de Degradação de Hidrocarbonetos.** Nas reações de PCR realizadas com os *primers* Alcano Desidrogenase (alkB), foi obtida amplificação positiva apenas para o isolado TRN7 (*Rhodococcus rhodochrous*) (Tabela 3), o que contrasta com a capacidade de crescimento de vários isolados quando cultivado em meio contendo apenas alcanos como fonte de carbono e energia (Tabela 4). Todos os isolados apresentaram resultado positivo para amplificação parcial do gene Catecol 2,3-Dioxigenase (C23DO). Não houve resultados positivos das reações de PCR com os *primers* para amplificação da subunidade alpha de Dioxigenases de hidroxilação de anéis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH-RHD $\alpha$ ), apesar de vários isolados terem demonstrado capacidade de utilização de compostos aromáticos simples, como benzeno e tolueno, e policíclicos aromáticos (Tabela 4).

**Tabela 3.** Presença de genes de vias de degradação de hidrocarbonetos para os 15 isolados da Ilha da Trindade obtidos por PCR.

	TR N1	TR N2	TR N3	TR N4	TR N5	TR N6	TR N7	TR N8	TR N9	TR N10	TR N11	TR H1	TR H2	TR H3	TR H4
<b>alkB</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C23DO</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>PAH- RHD<math>\alpha</math></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

alkB: Alcano desidrogenase; C23DO: Catechol 2,3-Dioxigenase; PAH-RHD $\alpha$ : Subunidade alpha de dioxigenases de hidroxilação de anéis de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

**2.3.3. Produção de Biossurfactantes.** Não foi observada hemólise ao redor das colônias dos isolados avaliados em ágar-sangue, a qual poderia servir de indício da produção de biossurfactantes pelos isolados (23). Igualmente, todos os isolados apresentaram resultado negativo nos testes de colapso da gota e espalhamento de óleo, o que evidencia que os mesmos não produzem biossurfactantes na condição de crescimento avaliada.

**2.3.4. Ensaio de Crescimento com Hidrocarbonetos.** Os quinze isolados foram incubados por 15 dias, pois alguns hidrocarbonetos possuem cadeias carbônicas muito longas, o que os torna mais recalcitrantes e impossibilita um rápido metabolismo pelas bactérias. Na tabela 4 são sumarizados os resultados deste ensaio. Dois dos isolados, TRN7 (*Rhodococcus rhodochrous*) e TRH1 (*Nocardia farcinica*), cresceram em todos os hidrocarbonetos.

**Tabela 4.** Avaliação do crescimento dos 15 isolados em meio BH contendo um dos hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia.

	T R N 1	T R N 2	T R N 3	T R N 4	T R N 5	T R N 6	T R N 7	T R N 8	T R N 9	TR N10	TR N11	T R H 1	T R H 2	T R H 3	T R H 4
<b>Fenantreno</b>							X	X				X	X		
<b>Pireno</b>				X	X		X	X				X	X		
<b>Antraceno</b>							X			X		X			
<b>Eicosano</b>							X					X			
<b>Pentacontano</b>							X					X			
<b>Triacontano</b>							X					X			
<b>Tetracosano</b>				X			X		X	X		X			
<b>Naftaleno</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
<b>Hexadecano</b>			X	X	X		X	X	X			X	X	X	X
<b>Octano</b>				X	X		X					X	X		
<b>Tolueno</b>							X					X			
<b>Xileno</b>							X	X				X		X	

Houve destaque para o isolado TRN7, que com cinco dias de incubação havia crescido em todos os meios. A avaliação do crescimento foi realizada por meio da análise visual da turbidez gerada nos meios.

## 2.4. DISCUSSÃO

A prospecção de bactérias com potencial de utilizar hidrocarbonetos de petróleo como única fonte de carbono e energia baseou-se na capacidade de crescimento em meio mineral contendo diferentes classes de hidrocarbonetos. O crescimento nessas condições foi tido como indicador de que os microrganismos obtidos possuem enzimas capazes de catabolizar tais compostos, ou que podem utilizá-los como substrato para co-metabolizar compostos mais recalcitrantes, como alcanos cíclicos (25), visto que os resultados de crescimento nem sempre puderam ser correlacionados com os das ampliações obtidas por PCR dos genes envolvidos no catabolismo dos hidrocarbonetos.

Os métodos de identificação utilizados (sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e análise do perfil de ácidos graxos – sistema MIDI) forneceram resultados complementares à definição taxonômica dos isolados obtidos. Por se tratar de uma biblioteca particular, o sistema MIDI não possui tantas linhagens depositadas quando comparado ao GenBank. Portanto, é fundamental utilizar mais de uma tecnologia de identificação, para que a complementariedade dos dados gerados possa dar maior confiabilidade aos resultados obtidos. Ao comparar os resultados de identificação, o isolado TRH1 foi identificado como *Gordonia sp.* pela sequência do 16S rRNA e como *Nocardia farcinica* por MIDI. Porém, a taxonomia para ambos os casos permanece confusa, em razão da reclassificações do gênero *Nocardia* para o gênero *Gordonia*, ou seja, são filogeneticamente semelhantes (26, 27). Os isolados TRH2, TRN4, TRN5 e TRN8 não foram identificados pelo perfil de ácidos graxos (MIDI, Sherlock), enquanto que, pela análise parcial do gene 16S rRNA, todos eles foram classificados como *Tistrella sp.* Da mesma forma, TRH3, TRN1, TRN2 e TRN3 também não foram identificados por MIDI, sendo classificados como *Exiguobacterium sp.* pela sequência parcial do gene 16S rRNA.

As bibliotecas do sistema MIDI contêm dados de cepas de referência do perfil de ácidos graxos de microrganismos cultivados sob condições padronizadas e, portanto, possuem alto grau de confiabilidade. Alguns autores criticam as identificações pelo GenBank em razão de problemas como erros nas sequências de bases, na anotação das sequências, ambiguidade de bases, sequências incompletas e *gaps* nas sequências (28–31). Entretanto, o controle de qualidade das sequências depositadas tem aumentado nos últimos anos, aumentando a credibilidade desse banco de dados (32, 33). Portanto,

como os resultados das duas técnicas foram semelhantes, sugere-se que ambas as metodologias de identificação empregadas garantem dados confiáveis taxonomicamente.

O dendrograma criado a partir das análises dos perfis de ácidos graxos, empregando-se o próprio software *Sherlock System* (MIDI) revela que, mesmo não pertencendo ao banco de dados da biblioteca de bactérias ambientais (ITSA1), os isolados TRN1, TRN2, TRN3 e TRH3 são possivelmente representantes de mesma subespécie, pois estão ligados por uma distância euclidiana menor que seis. Mesmo que os microrganismos não sejam identificados pelo *Sherlock System*, eles ainda podem ser incluídos no dendrograma, o que é uma vantagem quando se tem um grupo de isolados, visto que, através da comparação dos perfis de ácidos graxos, é possível correlacionar filogeneticamente microrganismos, desde que a comparação taxonômica seja realizada a níveis de espécies ou menor. Esse tipo de análise não deve ser aplicado para comparações de gêneros ou grupos maiores. Distâncias euclidianas iguais ou menores que 2,5 indicam um mesmo isolado, fato detectado para TRN1 e TRN3, TRN10 e TRN11 e, ainda, TRN4, TRN5 e TRN8. TRN9 parece pertencer à mesma subespécie de TRN10/TRN11. Quando as distâncias euclidianas dos perfis de ácidos graxos são menores que dez, considera-se que os microrganismos pertencem à mesma espécie, mas um valor maior que dez não necessariamente indica que sejam de espécies diferentes (34).

Dentre as técnicas de identificação microbiana disponíveis, todas possuem benefícios e limitações em suas aplicabilidades. Técnicas fenotípicas clássicas demandam tempo e muitas vezes a identificação envolve a subjetividade do executor (35). Em relação à identificação por 16S, existem controvérsias quanto à sua confiabilidade, sendo que já foi proposto que um índice de similaridade de sequências de 16S rRNA igual ou maior que 97 % fosse utilizado para a identificação de espécies bacterianas (36). Entretanto, alguns autores (37) defendem que a identidade de sequências 16S rRNA pode não ser suficiente para se garantir a identidade de espécies, mas um valor abaixo de 97 % de homologia é considerado suficiente para classificar dois isolados bacterianos como espécies distintas. Igualmente, a homologia de sequências de 16S rRNA é considerada como uma maneira útil na discriminação de gêneros ou grupos maiores (38). Embora a filogenia por 16S seja amplamente empregada na classificação de procariotos, ela perde resolução quando se trabalha em nível de espécies ou níveis menores (39) e, nesse estudo, mostrou distinção mesmo em

níveis pouco específicos. Entretanto, essa e outras técnicas independentes de cultivo possuem alto potencial para explorar a comunidade microbiana de amostras ambientais, podendo facilitar o estudo de fisiologia e ecologia dos microrganismos presentes (40). Portanto, para que ocorra uma identificação apurada, é necessário combinar as informações disponíveis de identificação, diversidade genética, fisiologia e ecologia microbiana para definir espécies de uma forma coerente e inferir suas funções dentro de um ecossistema (41).

Ao se confrontarem os resultados obtidos pelas reações de PCR com genes relacionados ao catabolismo de hidrocarbonetos e o crescimento em meios minerais, foram encontradas algumas divergências. Era esperado que os isolados que foram capazes de crescer em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), como fenantreno, naftaleno, pireno e antraceno, apresentassem resultado positivo na reação de amplificação para PAH-RHD $\alpha$ . Para o par de *primers* C23DO, esperava-se que a amplificação ocorresse apenas nos isolados que foram capazes de crescer em algum hidrocarboneto aromático, visto que o catecol é um intermediário comum formado durante a oxidação de PAH e necessita ser metabolizado com rapidez, pois apresenta alta toxicidade (42, 43). De forma similar, quase todos os isolados foram capazes de crescer em alguns dos *n*-alcanos disponibilizados, porém apenas o DNA do isolado TRN7 propiciou resultado positivo para a amplificação do gene alcano desidrogenase nas reações de amplificação com os *primers* alkB. Em relação à ausência do gene PAH-RHD $\alpha$ , o par de *primers* específico utilizado não resultou em nenhuma amplificação, um indício de que os isolados que cresceram em algum dos PAH disponibilizados possuem vias desconhecidas de catabolismo desses hidrocarbonetos. A amplificação para todos os isolados com os *primers* C23DO pode ser um indício de que as bactérias que não cresceram nos meios contendo PAH não são capazes de sintetizar enzimas que dão início à degradação de PAH e, portanto, podem realizar co-metabolismo do composto catecol no ambiente. Os amplicons dos controles positivos foram sequenciados e houve a confirmação de que os produtos de PCR eram de fato fragmentos dos genes catabólicos de interesse. Os resultados são consistentes com a existência de diferentes vias catabólicas ou variações nas sequências que codificam as enzimas de degradação. Indícios de novas vias de catabolismo de hidrocarbonetos são mostrados na literatura (25, 44), enfatizando que muitas ainda podem ser desconhecidas.

Os isolados *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1 foram capazes de utilizar todos os hidrocarbonetos avaliados como fontes de carbono e

energia. O isolado *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 apresentou maior velocidade de crescimento se comparado à *Nocardia farcinica* TRH1, visto que, após cinco dias de incubação, foi capaz de crescer em todos os meios contendo os hidrocarbonetos disponibilizados. Essa versatilidade catabólica habilita esses dois isolados como candidatos para a utilização em processos de biorremediação de acidentes envolvendo derramamento de petróleo e derivados em ambientes marinhos (15, 45) e mesmo em outros ambientes onde os mesmos possam se estabelecer como membros da comunidade microbiana.

O potencial de aplicação de *Rhodococcus spp.* em processos de biorremediação de solos e ambientes marinhos, o qual é relacionado com a capacidade de membros do gênero de degradarem eficientemente hidrocarbonetos do petróleo, é amplamente reconhecido, não só por atuarem no catabolismo de compostos alifáticos, mas também em compostos aromáticos, em diferentes condições de temperatura (10, 46–51). Representantes de *Nocardia spp.* também são citados como degradadores de hidrocarbonetos (50, 52, 53), realizando algumas vezes o co-metabolismo desses compostos (54). Os gêneros *Rhodococcus* e *Nocardia* estão filogeneticamente muito próximos (55), o que pode ser um indício de ambos possuírem linhagens com vias catabólicas de hidrocarbonetos semelhantes.

O uso de consórcios microbianos em processos de biorremediação é tido como sendo mais vantajoso do que o de culturas puras, uma vez que os consórcios proporcionam maior diversidade metabólica e maior possibilidade de adaptação em campo (56). Durante a seleção de microrganismos para utilização em processos de biorremediação, a utilização de vias metabólicas distintas e a capacidade de co-oxidar outros compostos presentes no meio são fatores a serem considerados, uma vez que esses favorecem a remoção mais rápida de misturas complexas de contaminantes e a degradação de compostos mais recalcitrantes (57).

Neste trabalho, foram isoladas cepas bacterianas com capacidade de degradar hidrocarbonetos, destacando-se entre essas as pertencentes às espécies *Rhodococcus rhodochrous* e *Nocardia farcinica*, que foram capazes de utilizar hidrocarbonetos de diferentes classes (alifáticos, aromáticos e PAH) como fonte de carbono e energia. Esses resultados apontam para o potencial dessas bactérias serem utilizadas em processos de biorremediação de petróleo. Em relação à produção de biossurfactantes pelos isolados, os resultados indicaram que nenhum deles é capaz de produzir esses compostos. Isso não afetou a sua capacidade de crescer utilizando hidrocarbonetos de elevada

hidrofobicidade (por exemplo, fenantreno, naftaleno e antraceno), o que nos leva a inferir que esses microrganismos utilizam outras estratégias para terem acesso a essa classe de compostos, como alta hidrofobicidade da superfície celular (58). O fato desses isolados terem sido obtidos de ambiente sem registro histórico de contaminação antrópica indica que o catabolismo de hidrocarbonetos é uma característica comum e amplamente distribuída. No caso de microrganismos marinhos, isso pode estar relacionado ao fato de hidrocarbonetos serem constituintes dos tecidos de plantas e animais (59) e que vazamentos naturais de reservatórios geológicos contribuem com volumes significativos de óleo nos oceanos, os quais podem chegar a mais de 600 milhões de litros a cada ano (60).

## 2.5. REFERÊNCIAS

1. **Kirby MF, Law RJ.** 2010. Accidental spills at sea--risk, impact, mitigation and the need for co-ordinated post-incident monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* **60**:797–803.
2. **Anderson AG.** 2002. The Media Politics of Oil Spills. *Spill Sci. Technol. Bull.* **7**:7–15.
3. **De la Huz R, Lastra M, Junoy J, Castellanos C, Viéitez JM.** 2005. Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: Preliminary study of the “Prestige” oil spill. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **65**:19–29.
4. **Laffon B, Rábade T, Pásaro E, Méndez J.** 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environ. Int.* **32**:342–8.
5. **Ritter, Keith Solomon, Paul Sibley, L.** 2002. Sources, Pathways, and Relative Risks of Contaminants in Surface Water and Groundwater: a Perspective Prepared for the Walkerton Inquiry. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* **65**:1–142.
6. **Chiou CT, Mcgroddy SE, Kile DE, Survey USG, Federal D.** 1998. Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments. *Environ. Sci. Technol.* **32**:264–269.
7. **Kingston PF.** 2002. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. *Spill Sci. Technol. Bull.* **7**:53–61.
8. **Atlas RM.** 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45**:180–209.

9. **Atlas RM.** 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation Oil Spills. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **52**:149–156.
10. **Haritash AK, Kaushik CP.** 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* **169**:1–15.
11. **Simpson CD, Mosi a a, Cullen WR, Reimer KJ.** 1996. Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada. *Sci. Total Environ.* **181**:265–78.
12. **Morales-Caselles C, Jiménez-Tenorio N, de Canales MLG, Sarasquete C, DelValls TA.** 2006. Ecotoxicity of sediments contaminated by the oil spill associated with the tanker “Prestige” using juveniles of the fish *Sparus aurata*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **51**:652–60.
13. **Khan FI, Husain T, Hejazi R.** 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* **71**:95–122.
14. **Gerlach SA.** 1981. Marine pollution: diagnosis and therapy *Marine pollution bulletin.* Springer-Verlag.
15. **Yu KSH, Wong a HY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY.** 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **51**:1071–7.
16. **Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, Knittel K, Ramette A, Reitz A, Samarkin V, Treude T, Boetius A.** 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **57**:2008–2021.
17. **Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM.** 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.* **102**:772–8.
18. **Almeida A, Moreira L, Bruno S, Thomé J, Martins A, Bolten A, Bjorndal K.** 2011. Green turtle nesting on Trindade Island, Brazil: abundance, trends, and biometrics. *Endanger. Species Res.* **14**:193–201.
19. **Sasser M.** 2001. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Technical note 101. Microbial ID, Inc., Newark, Del.
20. **Táncsics A, Szoboszlai S, Szabó I, Farkas M, Kovács B, Kukolya J, Mayer Z, Kriszt B.** 2012. Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environ. Sci. Technol.* **46**:232–40.

21. **Powell SM, Ferguson SH, Bowman JP, Snape I.** 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology* **52**:523-32.
22. **Ding G, Heuer H, Zühlke S, Spiteller M, Pronk GJ, Heister K, Kögel-Knabner I, Smalla K.** 2010. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:4765-71.
23. **Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ.** 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **56**:339-47.
24. **Bodour A a, Miller-Maier RM.** 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **32**:273-280.
25. **Koma D, Hasumi F, Chung S-Y, Kubo M.** 2003. Biodegradation of n-alkylcyclohexanes by co-oxidation via multiple pathways in *Acinetobacter* sp. ODDK71. *J. Biosci. Bioeng.* **95**:641-4.
26. **Shen F-T, Lu H-L, Lin J-L, Huang W-S, Arun a B, Young C-C.** 2006. Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the *gyrB* gene. *Res. Microbiol.* **157**:367-75.
27. **Arenskötter M, Bröker D, Arensko M, Bro D, Steinbu A.** 2004. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia* Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3195-3204.
28. **Miller H, Norton CN, Sarkar IN.** 2009. GenBank and PubMed: How connected are they? *BMC Res. Notes* **2**:101.
29. **Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A.** 2001. Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases : Identifying Nontuberculous Mycobacterium Species Necessity of Quality-Controlled 16S rRNA Gene Sequence Databases : Identifying Nontuberculous Mycobacterium Species. *J. od Clin. Microbiol.* **39**:3637-3648.
30. **Gilks WR, Audit B, De Angelis D, Tsoka S, Ouzounis C a.** 2002. Modeling the percolation of annotation errors in a database of protein sequences. *Bioinformatics* **18**:1641-9.
31. **Salzberg SL.** 2007. Genome re-annotation: a wiki solution? *Genome Biol.* **8**:102.
32. **Pennisi E.** 2008. DNA data. Proposal to “Wikify” GenBank meets stiff resistance. *Science* **319**:1598-9.
33. **Bidartondo M.** 2008. Preserving Accuracy in GenBank. *Science* (80-. ). **319**:1616.

34. **Kunitsky C, Osterhout G, Sasser M.** Microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the identification system.
35. **Stager CE, Davis JR.** 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:302–27.
36. **Stackebrandt E, Goebel BM.** 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:846–849.
37. **Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:166–70.
38. **Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R.** 2000. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3623–3630.
39. **Staley JT.** 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**:1899–909.
40. **Handelsman J.** 2004. Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms Metagenomics : Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Metagenomics Appl. Genomics to Unsultured Microorg.* **68**:669–685.
41. **Fraser, Christophe; Alm, Eric J.; Polz, Martin F.; Spratt, Brian G.; Hanage WP.** 2009. The Bacterial Species Challenge: Making Sense of Genetic and Ecological Diversity. *Science (80-. ).* **383**:741–746.
42. **Wilson SC, Jones KC.** 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* **81**:229–49.
43. **Oyd ELMB, Eharg ANAM, Right JUW, Illham KENK.** 1997. Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products (catechol and phenol ) using a lux -modified bacterial bioassay. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:849–856.
44. **Annweiler E, Michaelis W, Meckenstock RU.** 2002. Identical Ring Cleavage Products during Anaerobic Degradation of Naphthalene , 2-Methylnaphthalene , and Tetralin Indicate a New Metabolic Pathway Identical Ring Cleavage Products during Anaerobic Degradation of Naphthalene , 2-Methylnaphthalene , and Tet. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:852–858.
45. **Korda A, Santas P, Tenente A, Santas R.** 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and

- commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:677–86.
46. **Ruberto LA. M, Vazquez S, Lobalbo A., Mac Cormack WP.** 2005. Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarct. Sci.* **17**:47–56.
  47. **Nyer EK, Pauyne F, Sutherson S.** 2003. Discussion of environment vs. bacteria or let's play "Name the Bacteria". *Biotechnol. Bioeng.* **23**:36–45.
  48. **Silva, E. M.; Peso-Aguiar M. C.; Navarro M. F. T.; Barros, C., Chastinet A.** 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:112–118.
  49. **Dean-Ross D, Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE.** 2001. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**:205–11.
  50. **Alvarez M.** 2003. Relationship between  $\gamma$ -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **52**:35–42.
  51. **Malachowsky KJ, Phelps TJ, Teboli AB, Minnikin DE, White DC.** 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:542–8.
  52. **Sariaslani BFS, Harper DB, Higgins IJ.** 1974. Microbial Degradation of Hydrocarbons. *Biochem. J.* **140**:31–45.
  53. **Baek K-H, Yoon B-D, Kim B-H, Cho D-H, Lee I-S, Oh H-M, Kim H-S.** 2007. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:67–73.
  54. **Smith MR.** 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**:191–206.
  55. **Goodfellow M, Alderson G, Chun J.** 1998. Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **74**:3–20.
  56. **Nyer, Evan K.; Payne, Fred; Sutherson S.** 2003. Discussion of Environment vs. Bacteria or Let's Play, "Name that Bacteria". *Ground Water Monit. Remediat.* **23**:36–45.
  57. **Perry JJ.** 1979. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **43**:59–72.
  58. **Prabhu Y, Phale PS.** 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface

- hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**:342–51.
59. **Sharkey TD.** 1996. Isoprene synthesis by plants and animals. *Endeavour* **20**:74–8.
60. **Prince RC.** 2005. The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation, p. 317–336. *In* Ollivier, B, Magot, M (eds.), *Petroleum Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C.

### **CAPÍTULO 3**

## **DIVERSIDADE MICROBIANA E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ESTRATÉGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR MICRORGANISMOS NAS ADJACÊNCIAS DA ILHA DA TRINDADE - BRASIL**

### **RESUMO**

Hidrocarbonetos do petróleo são compostos que causam problemas econômicos e ambientais quando derramados em ambientes naturais, pois são de difícil remoção do ambiente. Esse estudo analisou a diversidade microbiana que coloniza a superfície do petróleo após seu contato com a água do mar no entorno da Ilha da Trindade e simulou a eficiência de oito diferentes estratégias de biorremediação para esse ambiente. As análises de diversidade foram feitas a partir de cupons de acrílico que serviram de substrato para a inserção do petróleo no mar. Ao longo de 30 dias, os cupons foram amostrados e o DNA do biofilme formado na superfície do óleo foi extraído e utilizado para a análise de diversidade por meio de T-RFLP multiplex para fungos, *Bacteria* e *Archaea*. As estratégias de biorremediação foram simuladas em frascos respirométricos acoplados a um respirômetro de detecção de CO<sub>2</sub> por infravermelho. As análises de diversidade mostraram que o domínio *Bacteria* é o mais dominante na colonização do óleo em relação a *Archaea* e fungos e que a riqueza de espécies aderidas ao óleo aumentou gradativamente com o decorrer dos 30 dias de exposição dos cupons. Dentre as estratégias de biorremediação, a bioestimulação utilizando biosurfactante, KNO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, juntamente com a bioaugmentação com o isolado *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 foi a que propiciou a maior liberação de CO<sub>2</sub> (2415,74 µmol) em relação ao controle contendo apenas água do mar e óleo cru (277,14 µmol de CO<sub>2</sub>). Portanto, a associação da bioestimulação e bioaugmentação aparece como uma técnica eficiente para a remediação de petróleo no litoral da Ilha da Trindade.

### **3.1. INTRODUÇÃO**

Ambientes marinhos estão sujeitos à contaminação por compostos gerados ou descartados por ações antropogênicas. O óleo cru é um dos mais importantes poluentes orgânicos nos ambientes marinhos, pois acarreta uma série de problemas econômicos e

socioambientais (1, 2). Acidentes envolvendo o derramamento de óleo tornam-se ainda mais danosos quando o contaminante entra em contato com ambientes costeiros, que estão dentre os habitats mais produtivos do planeta, acarretando a degradação e redução da diversidade biológica nesses ecossistemas (3). O acidente envolvendo a plataforma de extração da *Deepwater Horizon*, no Golfo do México, em 2010, afetou uma grande área costeira dos Estados Unidos. Para minimizar os impactos causados, uma série de medidas foi tomada para remediar os locais afetados, mas estima-se que cerca de 25 % do óleo permaneceram no ambiente (4).

Dentre as alternativas de remediação, estão disponíveis tratamentos físicos, químicos e biológicos. Tratamentos físicos e químicos geralmente causam a dispersão do poluente e não sua efetiva remoção, tornando sua eficácia limitada, além de apresentarem custos elevados. Já o tratamento biológico, utilizando microrganismos, se comparada aos outros métodos, apresenta baixo custo, alta eficiência e não causa poluição secundária (5, 6). Dentre as tecnologias de remediação existentes, nenhuma fornece alta eficiência na remoção dos contaminantes, sendo que a eficácia de remoção pode ser potencializada quando são utilizadas metodologias de remediação em conjunto (7).

O petróleo e seus derivados, quando introduzidos em ambientes marinhos, sofrem mudanças por ação de fatores físicos, químicos e biológicos, incluindo evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, emulsificação, adsorção em matérias particuladas e sedimentação (8, 9). Esses processos ocorrem simultaneamente e causam mudanças nas propriedades físicas do poluente, afetando diretamente os processos de permanência dos hidrocarbonetos no ambiente (10).

Microrganismos com capacidade de degradar petróleo são ubíquos, mas ocorrem em pequena proporção em ambientes não contaminados, constituindo menos de 0,1% da comunidade microbiana total. Porém, esse número pode chegar a 100% após uma contaminação (9). Diversas espécies de bactérias, arqueas e fungos podem degradar hidrocarbonetos provenientes do petróleo (11–13). A biorremediação de locais contaminados depende das capacidades metabólicas dos microrganismos para converterem os poluentes orgânicos em compostos que não apresentam toxicidade ou que sejam menos danosos para o ambiente (14).

Sob condições aeróbias, muitos hidrocarbonetos do petróleo podem ser biodegradados, embora resinas, moléculas polares e asfaltenos sejam altamente recalcitrantes. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) estão em baixa

concentração no óleo cru, porém são muito tóxicos e recalcitrantes (13). Bactérias podem mineralizar PAHs completamente a dióxido de carbono e água na presença de oxigênio, em geral envolvendo a ação de enzimas dioxigenases (10). Os processos de remediação *in situ* utilizados em campo são classificados como: atenuação natural ou bioatenuação, bioaumentação e bioestimulação (14).

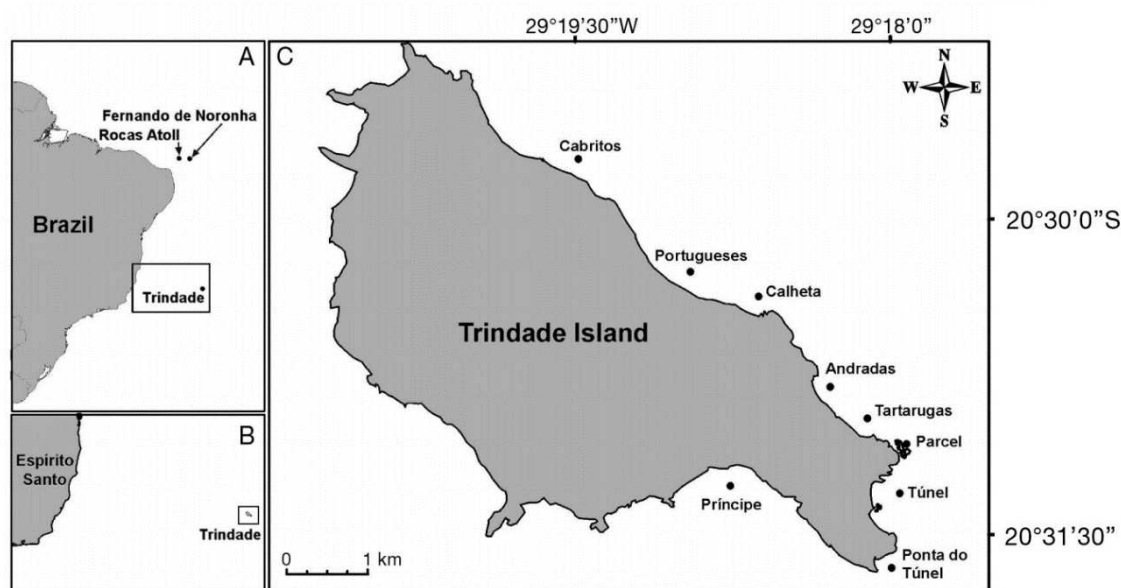
No Brasil, a extração de petróleo ocorre quase que exclusivamente em águas profundas e a exploração tende a aumentar com as descobertas de campos de produção na região do pré-sal (15). Na mesma latitude da Bacia de Campos, a maior produtora de petróleo no Brasil, encontra-se a Ilha da Trindade, uma ilha oceânica sem indícios de contaminação por hidrocarbonetos do petróleo e habitat de espécies de plantas e animais endêmicos (16, 17). A ilha é um importante ponto estratégico nacional, pois garante uma zona de exploração econômica exclusiva com raio de 200 milhas náuticas ao Brasil e onde são colhidas informações meteorológicas, maregráficas e geofísicas que são distribuídas para todo o mundo.

A poluição por hidrocarbonetos do petróleo pode estimular o crescimento de microrganismos ambientais capazes de catabolizar esses contaminantes, ocasionando mudanças na estrutura da comunidade microbiana da área afetada. A identificação de organismos que metabolizam hidrocarbonetos é importante para entender, avaliar e desenvolver estratégias de biorremediação *in situ* (18). O objetivo do presente trabalho foi elucidar a dinâmica da comunidade microbiana que coloniza a superfície do óleo ao longo do tempo de exposição no mar e avaliar a eficiência das diferentes estratégias de biorremediação quando aplicadas de maneira isolada e em conjunto.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

**3.2.1. Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras.** Os procedimentos para realizar a montagem do experimento foram realizados na costa da Ilha da Trindade – Brasil, uma ilha oceânica distante aproximadamente 1140 km da costa da cidade de Vitória, ES – Brasil (Figura 1). Uma haste de alumínio contendo placas de acrílico (10 cm<sup>2</sup>) com uma delgada camada de petróleo curado foi presa a uma bóia fixa a aproximadamente 100 m de distância da Praia das Tartarugas, na Ilha da Trindade. O material foi mantido a 30 cm de profundidade ao longo de 60 dias. Nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 foram realizadas coletas em triplicadas das placas contendo petróleo. Após a coleta, as placas foram imediatamente armazenadas em tubos do tipo Falcon estéreis e preservadas em nitrogênio líquido. Foi realizada também, em

triplicata, a coleta de 5 L de água em regiões próximas à montagem do experimento. As amostras de água foram armazenadas a 4 °C e transportadas para o laboratório.



**Figura 1.** Localização geográfica da Ilha da Trindade. A e B. Ilha da Trindade em relação à costa do Brasil; C. Mapa da Ilha da Trindade, com nome de algumas das principais praias do local. Adaptada de Almeida *et al.*, 2011 (19).

**3.2.2. Ensaio de Colonização *ex situ*.** Com as amostras de água trazidas para o laboratório, foi montado um experimento em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL da água coletada. Cada um dos 21 frascos recebeu uma placa de acrílico (4 cm x 3 cm) pincelada com uma fina camada de petróleo curado em sua superfície. Os frascos foram incubados sob agitação de 180 rpm durante 60 dias a 24 °C, que é a temperatura média da água no local de coleta. Aos 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias após o início da incubação, foram coletados três frascos e as placas contendo o petróleo foram armazenadas em ultrafreezer.

**3.2.3. Extração de DNA.** A extração de DNA do biofilme formado na superfície do petróleo contido nas placas, tanto dos procedimentos realizados *in situ* quanto *ex situ*, foi realizada com modificação nas instruções do fabricante do RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MO BIO) acoplado ao RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit (MO BIO). Após o descongelamento das placas contendo o óleo, foram adicionadas as soluções “Bead Solution”, “Solution SR1” e “Solution SR2” em um béquer de vidro. A superfície da placa contendo o petróleo foi inserida com a face do óleo voltada para o conjunto de soluções e foi sonicada por 10 minutos em um equipamento Branson 1510 Ultrasonic Cleaner (Branson Ultrasonics Corp.). O

conteúdo líquido foi então transferido para o “Bead Tube” e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante a partir do terceiro passo do protocolo. Para a recuperação do DNA das amostras durante os procedimentos de extração, foi utilizado o RNA PowerSoil® DNA Elution Accessory Kit (MO BIO) e os passos seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

Para a extração de DNA das amostras de água, foram realizadas filtrações a vácuo utilizando-se filtros de membrana de ésteres com diâmetro de poros de 0,22 µm. Após a filtração, a extração prosseguiu com o PowerWater® DNA Isolation Kit (MO BIO) e os procedimentos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante.

**3.2.4. PCR – T-RFLP multiplex.** A PCR foi realizada com um conjunto de três pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1). A reação de 50 µL continha 1,0 µL dos primers 63F e 1087R NED a 10µM, 2,0 µL dos primers ITS1F FAM, ITS4, Ar927R HEX e Ar3F a 10µM, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 2,5 U de Taq Polimerase e 2µL de DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador automático, conforme o seguinte programa: 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, com extensão final de 10 minutos a 72 °C.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR- T-RFLP *multiplex*.

Iniciador	Marcação	Sequência de 5' para 3'	Gene alvo	Grupo
63f	-	AGGCCTAACACATGCAAGTC	16S rRNA	Bacteria
1087r	NED (amarelo)	[NED]-CTCGTTGCGGGACTTACCCC	16S rRNA	Bacteria
ITS1f	6-FAM (azul)	[6-FAM]-CTTGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS (18S rRNA)	Fungi
ITS4	-	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS (18S rRNA)	Fungi
Ar3F	-	TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA	16S rRNA	Archaea
Ar927R	HEX (verde)	[HEX]-CCC GCC AAT TCC TTT AAG TTT C	16S rRNA	Archaea

Os produtos da amplificação foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE 1X. Em seguida, foram purificados com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare®) e eluídos em 25 µL de tampão de eluição. Prosseguiu-se com a digestão enzimática de cada produto

amplificado em uma reação (30  $\mu$ L) contendo todo o produto amplificado, 10 U da enzima de restrição *Mspi*, 0,3  $\mu$ L de BSA acetilado (PROMEGA) e tampão B (disponibilizado com a enzima *Mspi* – PROMEGA) em concentração final de 1X. A digestão foi realizada em termociclador a 37 °C por 3 h, seguida de um período de inativação da enzima por 15 minutos a 95 °C. Os produtos foram precipitados e posteriormente ressuspensos em placa contendo MegaBace Loading Solution (Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>) e o marcador ET550-R (GE Healthcare). O *mix* na placa foi submetido à desnaturação a 95 °C por 5 minutos e mantido no gelo até a corrida em sequenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/GE Healthcare<sup>®</sup>), utilizando o conjunto de filtros *Genotyping filter set 2*. As condições da corrida foram: tempo de injeção de 60 seg., tensão de injeção de 4 kV, tempo de corrida de 120 min. e tensão de corrida de 10 kV.

**3.2.5. Análises de T-RFLP.** A análise dos dados após a corrida no sequenciador foi realizada com o programa *Gene Marker 2.4.1 Trial Version* (Soft Genetics, State College), após alteração do canal de cores para “*MegaBACE channels*” e aplicação manual de matriz espectral gerada pela análise do sinal de cada corante fluorescente separadamente (Fluorescent Amidite Matrix Standard, Applied Biosystems<sup>®</sup>). A análise de fragmentos terminais foi realizada considerando-se apenas os fragmentos entre 50 e 550 pb. Todos os picos gerados foram conferidos manualmente e os que apresentaram intensidades menores que 40 unidades de fluorescência foram excluídos para minimizar os efeitos de ruído. A abundância relativa de cada pico foi calculada assim como a proporção de todas as áreas dos picos nas amostras antes das análises estatísticas. Os índices ecológicos de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson e riqueza de Margalef foram calculados a partir dos dados de abundância relativa de ribotipos e intensidades dos picos do T-RFLP. Análises de agrupamento do perfil das comunidades foram realizadas utilizando como coeficiente de associação a distância euclidiana. Foi realizada também a análise de componentes principais (PCA) para os três grupos microbianos.

**3.2.6. Produção, Purificação e Quantificação de Biossurfactante.** Para a produção de ramnolipídeo, foi utilizada a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* PA01. O isolado foi ativado em ágar TSA (24 h; 30 °C). Uma colônia foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de caldo TSB, seguindo-se incubação a 30 °C sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. Uma alíquota de 1 mL das células em TSB foi inoculada em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de semeadura

(16), com incubação a 30 °C sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. Posteriormente, 30 mL desse inóculo foram transferidas para 1.000 mL do meio de produção (16). As condições de fermentação foram: agitação de 150 rpm, fluxo de ar de 1,7 SLPM e 30 °C por 48 h em um fermentador New Brunswick BioFlo®/CelliGen® 115 (Eppendorf). Para a purificação do ramnolípídeo, foram realizadas modificações de protocolos encontrados na literatura (17, 18). A cultura foi autoclavada, centrifugada a 6.800 x g por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Foi adicionado HCl 6,0 mol L<sup>-1</sup> para se obter um valor de pH igual a 2,0. O conteúdo foi armazenado a 4 °C *overnight* e novamente autoclavado. O precipitado foi recolhido e ressuspendido em água. O pH do conteúdo ressuspendido foi neutralizado e prosseguiu-se com a adição de clorofórmio:etanol (2:1) na proporção de 1:1. A mistura foi deixada em um funil de separação e a fase orgânica coletada. Esse procedimento de lavagem foi realizado mais duas vezes. A fase orgânica foi transferida para um frasco de vidro de fundo redondo conectado a um rota-evaporador para remover o solvente a 40 °C, obtendo-se um conteúdo escuro viscoso que foi ressuspendido em água e o pH mantido neutro. A tensão superficial foi empregada para se determinar a concentração relativa de biossurfactante, utilizando-se a técnica da diluição micelar crítica (DMC). Para tanto, foi utilizado um tensiômetro DCAT 11EC (DataPhysics Instruments). Os dados de tensão superficial foram utilizados para a construção do gráfico de concentração da solução de biossurfactante (50% a 1%) e tensão superficial. A DMC foi estimada no ponto em que a tensão superficial começou a subir abruptamente.

**3.2.7. Produção do Inóculo.** A estirpe *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, isolada nas adjacências da Ilha da Trindade e caracterizada como de rápido crescimento e capaz de crescer utilizando diferentes frações de hidrocarbonetos de petróleo, foi utilizada como inóculo. A bactéria foi cultivada em caldo nutriente por 24 h a 30 °C a 200 rpm. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com NaCl a 37 g L<sup>-1</sup> (concentração de NaCl na água coletada na Ilha da Trindade). A concentração celular foi estimada por meio da densidade óptica a 600 nm.

**3.2.8. Biorremediação.** O experimento de biorremediação foi conduzido com um controle e quatro tratamentos (Tabela 2), simulando-se as estratégias de atenuação natural (T1), bioaugmentação (T2), bioestimulação (T3) e o conjunto das duas últimas (T4). Água do mar (50 mL) coletada a aproximadamente 100 m da costa da Ilha da Trindade e mantida sob refrigeração, foi adicionada a frascos respirométricos de 125 mL. A contaminação consistiu da adição de 0,100 g ( $\pm$  0,046) de petróleo, que foi

previamente aquecido gradativamente até 210 °C, para a perda dos compostos mais voláteis.

**Tabela 2.** Tratamentos do experimento de biorremediação

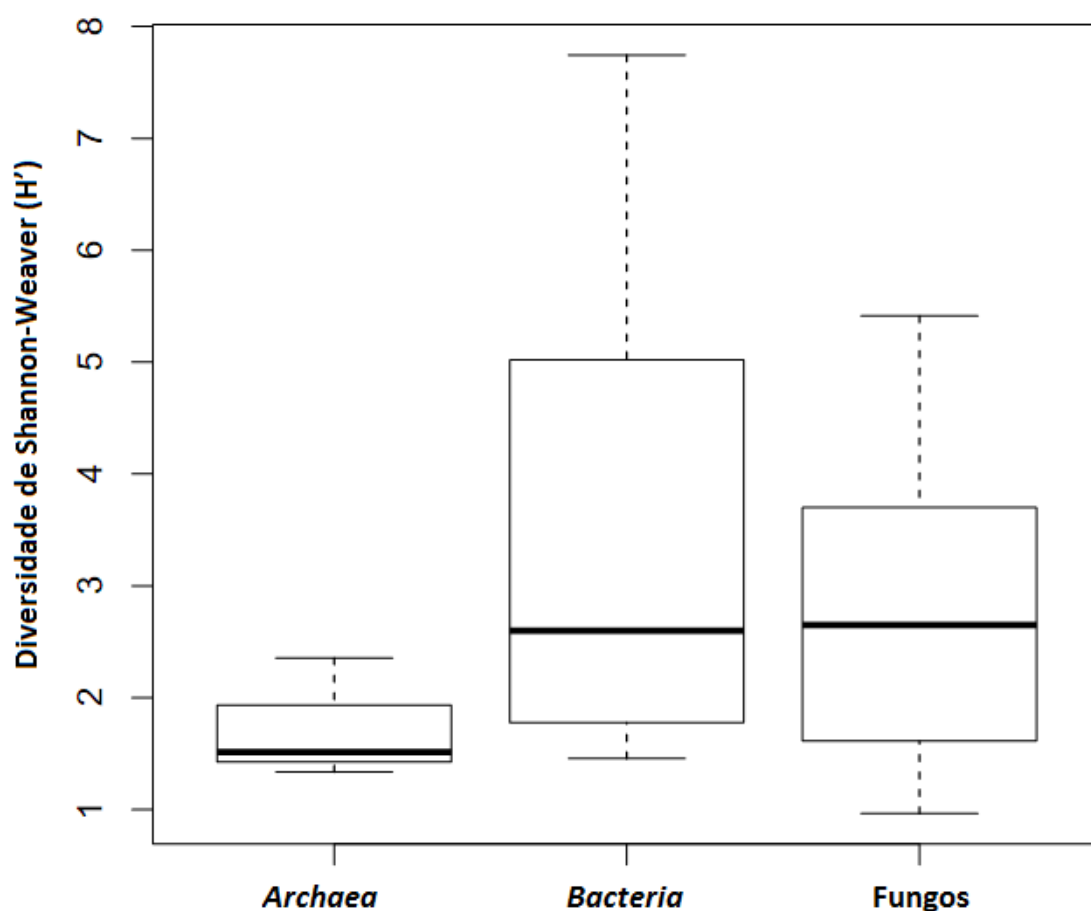
Tratamento	Descrição
C	Água (controle)
T1	Água + Petróleo
T2	Água+ Inóculo + Petróleo
T3	Água + Biossurfactante + Petróleo
T4	Água + Biossurfactante + Inóculo + Petróleo

Nos tratamentos contendo biossurfactante, o ramnolípídeo foi adicionado para se obter uma concentração equivalente a 2,5 x a concentração micelar crítica (CMC). Nos tratamentos que receberam nutrientes, foram utilizados  $\text{KNO}_3$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como fontes de nitrogênio e fósforo, respectivamente. Os nutrientes foram adicionados para se obter uma concentração final de 200 mg de nitrogênio e 20 mg de fósforo (20). O inóculo consistiu na adição de  $1,0 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  do isolado *Rhodococcus rhodochrous* TRN7. Após a montagem dos microcosmos, os frascos respirométricos foram incubados a 24 °C e a taxa respirométrica foi medida por um respirômetro de fluxo com detector de dióxido de carbono por infravermelho (Sable Systems, Las Vegas, USA). As amostras eram oxigenadas durante 228 segundos em um intervalo de 3,88 horas.

**3.2.9. Análises Estatísticas.** As análises foram realizadas no software “R”. Para os dados respirométricos e de diversidade, inicialmente os testes F e Shapiro-Wilks foram utilizados para testar a variância e normalidade dos dados, respectivamente. Os dados considerados não-paramétricos foram então submetidos à análise com o teste de Wilcoxon a 5 % de probabilidade.

### 3.3. RESULTADOS

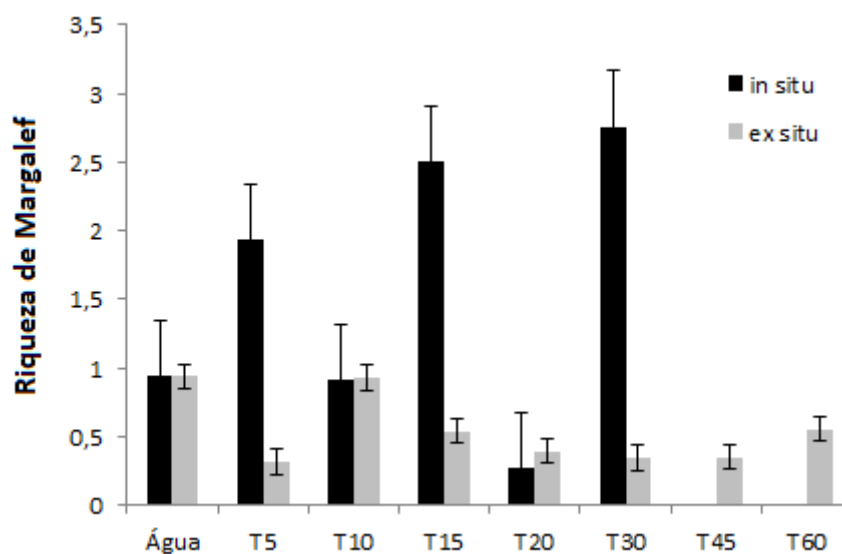
**3.3.1. Análise da Estrutura da Comunidade Microbiana.** O domínio *Bacteria* foi o grupo encontrado em maior diversidade nos cupons incubados *in situ*. Não houve diferença significativa entre *Archaea* e fungos (Figura 2), sendo que os valores foram estatisticamente iguais aos do experimento *ex situ*. A diversidade de fungos não mostrou variação ao longo do tempo, enquanto representantes do domínio *Archaea* foram encontrados apenas nos tempos T5 e T30 no experimento em campo e nos tempos T10 e T60 nos experimentos em laboratório (Figura 5). Não houve diferença significativa do índice de diversidade desse grupo nos tempos em que foi encontrado e entre os tratamentos em campo e em laboratório.



**Figura 2.** Valores médios do índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) para os três grandes grupos de microrganismos analisados na experimentação *in situ*. As caixas indicam onde estão contidos 50 % dos dados; a linha escura dentro das caixas indica a mediana; as barras externas correspondem aos dados extremos, porém não discrepantes.

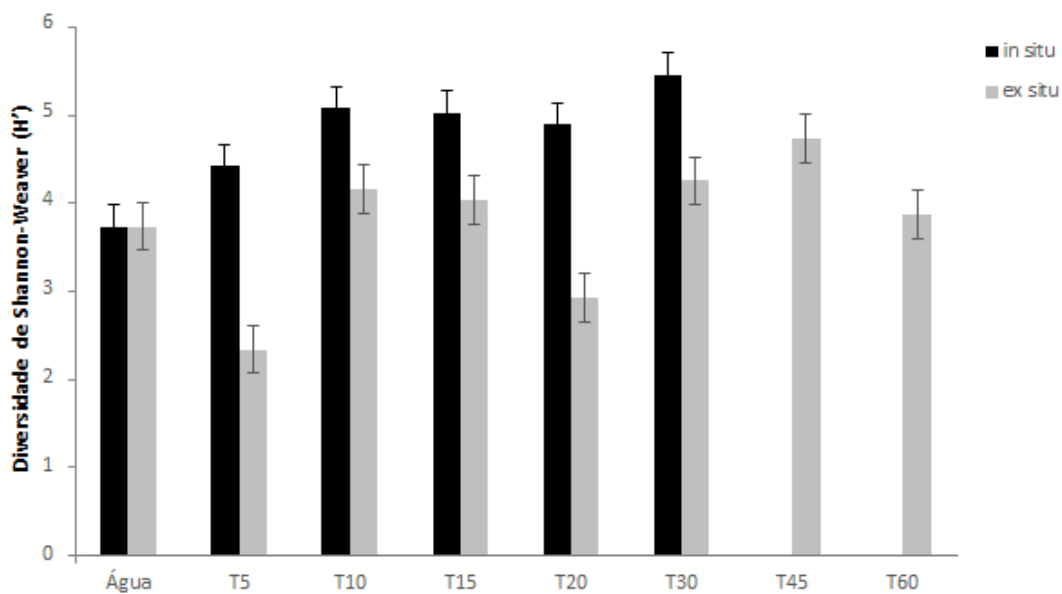
A riqueza de espécies bacterianas que colonizaram a superfície dos cupons contendo petróleo, no experimento conduzido *in situ*, aumentou significativamente nos primeiros cinco dias, em comparação com a encontrada na água no tempo zero (Figura

3). Houve oscilação ao longo do tempo e, após 30 dias, a riqueza atingiu seu valor mais alto. No experimento em laboratório, a riqueza sofreu declínio ao longo do tempo.



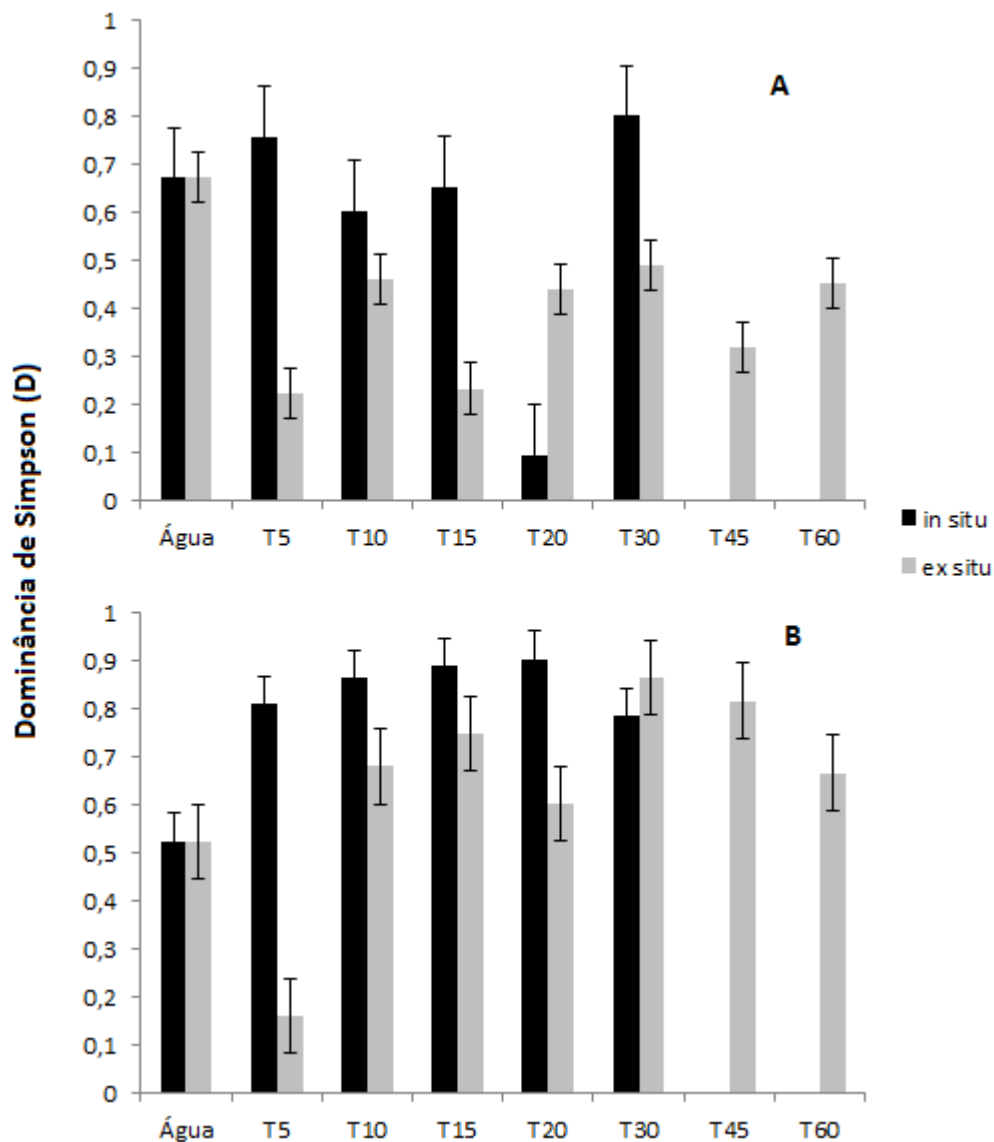
**Figura 3.** Riqueza de Margalef (R) das comunidades bacterianas durante sucessão ecológica da comunidade microbiana que colonizou a superfície do petróleo nos experimentos realizados *in situ* e *ex situ*, obtidas através dos dados de T-RFLP.

Assim como a diversidade, a riqueza e dominância de espécies de *Archaea* não variou nos momentos em que representantes deste domínio detectados em ambos os experimentos (Dados não apresentados). Em relação aos fungos, o índice  $H'$  manteve-se constante (Figura 4).



**Figura 4.** Diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) das comunidades fúngicas durante sucessão ecológica da comunidade microbiana que colonizou a superfície do petróleo nos experimentos realizados *in situ* e *ex situ*, obtidas através dos dados de T-RFLP.

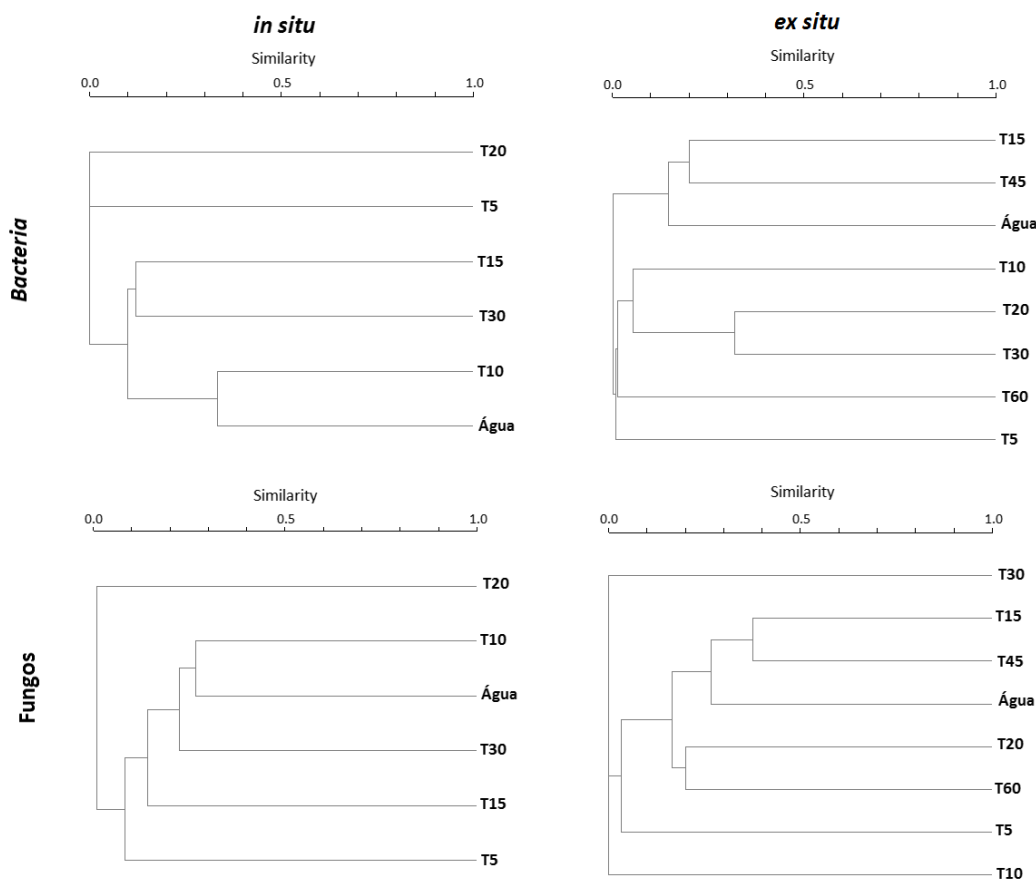
Houve decréscimo do índice de dominância de Simpson ( $D$ ) das comunidades de *Bacteria* e de fungos nos experimentos em laboratório nos primeiros cinco dias de incubação, enquanto que, no experimento em campo, os valores não diferiram estatisticamente (Figura 5).



**Figura 5.** Dominância de Simpson (D) das comunidades bacterianas (A) e de fungos (B) durante sucessão ecológica da comunidade microbiana que colonizou a superfície do petróleo nos experimentos realizados *in situ* e *ex situ*, obtidas através dos dados de T-RFLP.

**3.3.2. Análises de Agrupamento.** As análises realizadas por índice de similaridade de Jacard com o domínio *Bacteria* e fungos (Figura 6), originadas de dados de T-RFLP, revelaram que não existe um padrão de similaridade entre as comunidade destes grupos ao longo dos tempos amostrados. Durante todas as amostragens, observaram-se baixos valores de similaridade entre as comunidades encontradas nos tempos subsequentes tanto no experimento *in situ* quanto no experimento *ex situ*. Como o domínio *Archaea* foi detectado apenas nos tempos 5 e 30 dias no experimento *in situ* e 10 e 60 dias no experimento *ex situ*, não foram feitas análises de agrupamento para esse grupo. Os maiores valores de similaridade, tanto para *Bacteria* quanto para fungos,

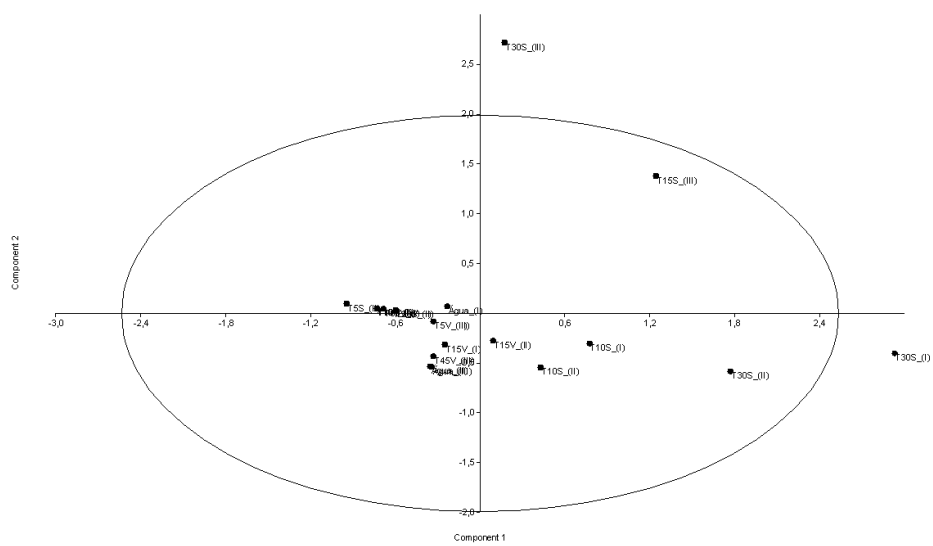
chegaram próximos a 0,4, no experimento *ex situ*. Entretanto, as comunidades de fungos com esses valores são distantes temporalmente, enquanto para o domínio *Bacteria*, os valores mais elevados de similaridade foram obtidos com amostras coletadas em tempos subsequentes (T20 e T30 no experimento *ex situ*) e na água e em T10 no experimento *in situ*.



**Figura 6.** Análises de agrupamento dos perfis das comunidades de *Bacteria* e fungos, realizadas utilizando o índice de similaridade de Jacard como coeficiente de associação a partir de dados de T-RFLP.

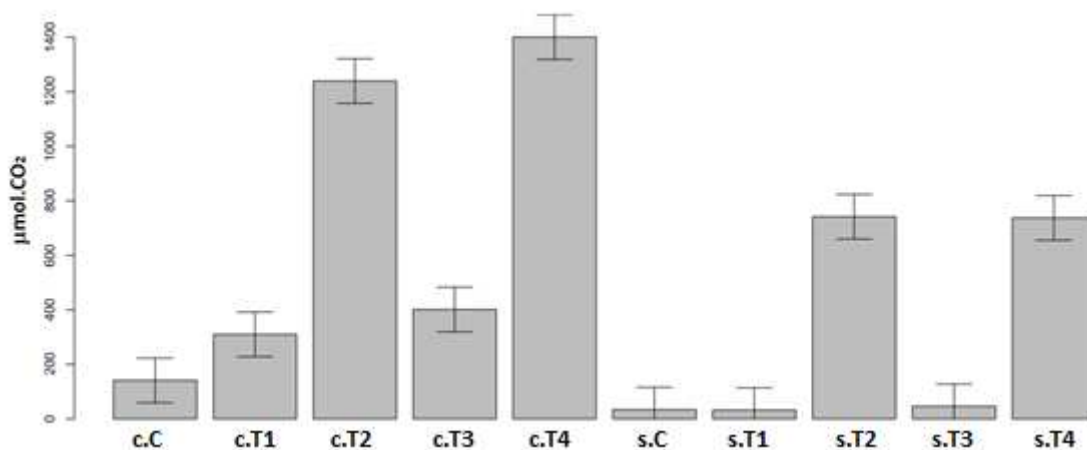
A análise de componentes principais revelou que não existe diferença significativa entre as comunidades fúngicas temporalmente, ao se compararem os experimentos *in situ* e *ex situ* e entre ambos, porém, observa-se grande dispersão dos dados, dentro da área de plotagem (Figura 7).





**Figura 9.** Análises de componentes principais para o domínio *Bacteria*, com 5 % de probabilidade nos experimentos *in situ* e *ex situ*.

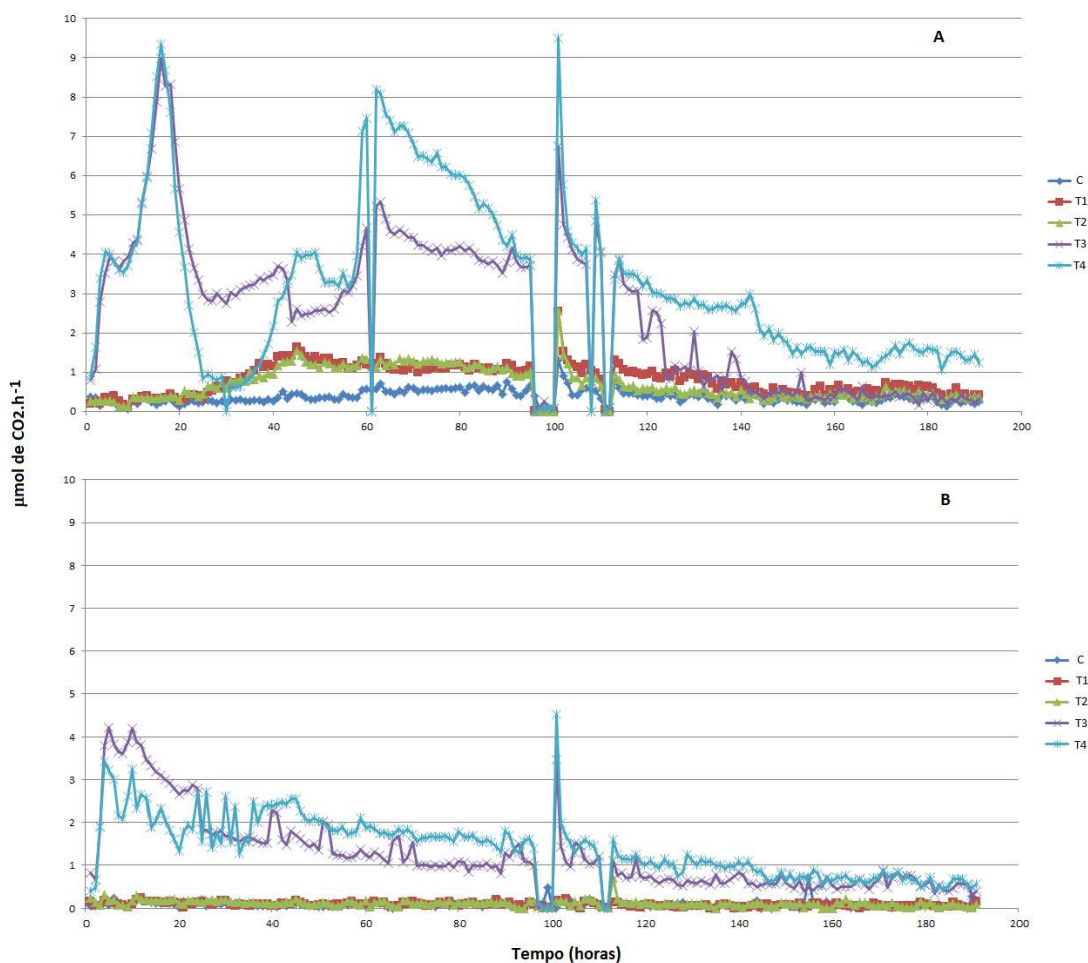
**3.3.3. Avaliação do Potencial para Biorremediação na Região Litorânea da Ilha da Trindade.** Dentre os tratamentos onde não houve adição de nutrientes, s.T2 e s.T4 apresentaram os maiores valores de emissão de CO<sub>2</sub> (1.134,95 μmol de CO<sub>2</sub> e 1.151,16 μmol de CO<sub>2</sub>, respectivamente), enquanto que o tratamento s.T2 (53,86 μmol de CO<sub>2</sub>) não se distinguiu estatisticamente do controle s.C (61,14 μmol de CO<sub>2</sub>) (Figura 10). Dentre os tratamentos que receberam adição dos nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio, a atividade respiratória diferiu entre todos eles de acordo com o teste de Wilcoxon a 5 % de probabilidade (Figura 10). A maior liberação de dióxido de carbono ocorreu no tratamento c.T4 (2.415,74 μmol de CO<sub>2</sub>), valor cerca de 40 vezes maior do que o obtido no tratamento que recebeu somente o petróleo (s.T1).



**Figura 10.** Dióxido de carbono liberado ao longo de 31 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação. Nos tratamentos com “c.” houve adição de KNO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; tratamentos com “s.” não receberam nutrientes; c.C e s.C são tratamentos controle; c.T1 e s.T1 são tratamentos contendo petróleo; c.T2 e s.T2 são tratamentos contendo petróleo e biossurfactante; c.T3 e s.T3 são tratamentos contendo petróleo e inóculo; c.T4 e s.T4 são tratamentos contendo petróleo, inóculo e biossurfactante.

Nos tratamentos com simulação de bioestimulação (adição de KNO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), observam-se três picos de maior atividade microbiana (Figura 11A), sendo que cada pico é sucedido por uma queda na atividade respiratória, mas de tempo de decaimento diferentes. O gráfico (Figura 11B) com as simulações que não apresentam bioestimulação mostra um decaimento gradual nas taxas de respiração no decorrer do tempo. Nos tratamentos que não receberam nutrientes, as diferenças entre os tratamentos foi menor, sendo que o tratamento que recebeu apenas petróleo não diferiu do controle e o tratamento que recebeu petróleo + biossurfactante foi semelhante ao que recebeu petróleo + biossurfactante + inóculo. O fator que mais estimulou a atividade

respiratória nos tratamentos foi a adição de biossurfactantes (Figura 11B). Os tratamentos que o receberam mostraram valores de liberação de dióxido de carbono muito acima dos demais.



**Figura 11.** Análise temporal das taxas de emissão de CO<sub>2</sub> durante os 31 dias em foram realizadas as simulações das estratégias de biorremediação. “C”: tratamento controle; “T1”: tratamentos contendo petróleo; “T2”: tratamentos contendo petróleo e biossurfactante; “T3”: tratamentos contendo petróleo e inóculo; “T4”: tratamentos contendo petróleo, inóculo e biossurfactante. **A:** Tratamentos com adição de KNO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; **B:** Tratamentos sem adição de nutrientes.

### 3.4. DISCUSSÃO

Por aderência do óleo a uma superfície sólida, é possível estudar os processos de colonização microbiana na interface entre óleo e água. Em contrapartida, a dinâmica da comunidade é influenciada pela dispersão do óleo na água ao longo do tempo. As populações microbianas aderidas à superfície do óleo irão compor uma comunidade com propriedades interessantes para se estudar processos microbianos e físico-químicos que levam à biodegradação e dissolução do óleo, para o esgotamento dos hidrocarbonetos (21). A comunidade microbiana presente no ambiente necessita se adaptar às novas condições para poder colonizar a superfície do óleo (13, 22, 23). O aumento da riqueza de espécies de bactérias e fungos após os primeiros dias de contaminação sustenta essa afirmativa. O domínio *Archaea* não parece possuir muitas espécies aeróbias capazes de colonizar o óleo e fazer parte da comunidade microbiana, visto que esse grupo foi detectado em poucas amostras. Em nossos estudos, a riqueza de espécies dos três grupos analisados foi frequentemente maior no experimento realizado *in situ*. Conclui-se, portanto, que a tentativa de se reproduzir a dinâmica de comunidades microbianas em laboratório pode não ser uma estratégia adequada para simular os processos de sucessão que ocorrem em campo. A diferença na riqueza de espécies, nesse caso, pode ser explicada pela renovação constante de correntes marinhas carreando espécies microbianas diferentes das que estavam presentes apenas no momento de coleta das amostras de água utilizadas no experimento em laboratório, possibilitando o contato de maior número de espécies com o óleo ao longo do período de estudo.

Nos experimentos simulando estratégias de biorremediação, observou-se a degradação de hidrocarbonetos pela microbiota indígena da água do entorno da Ilha da Trindade. A bioestimulação, utilizando-se o biossurfactante ramnolípídeo,  $\text{KNO}_3$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , mostrou ser uma estratégia promissora para estimular a comunidade microbiana autóctone a utilizar os hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e, assim, levar ao esgotamento ou diminuição desses compostos no ambiente contaminado. Porém, como mostram alguns trabalhos (24–28), para que a aplicação em ambiente natural ocorra com sucesso, a utilização de nutrientes na forma de moléculas hidrofóbicas é mais vantajosa, visto que, ao entrarem em contato com o óleo, elas podem se aderir e, assim, não se dispersam no meio. Os tratamentos que não receberam nutrientes apresentaram os piores resultados de atividade microbiana, o que demonstra

que um acidente envolvendo derramamento de petróleo no entorno da Ilha da Trindade pode ocasionar danos ambientais graves, pois a comunidade microbiana indígena, apesar de possuir a capacidade de degradar hidrocarbonetos, não consegue fazê-lo, visto que a alta razão carbono/nitrogênio e carbono/fósforo dificulta o catabolismo dos hidrocarbonetos (7, 29, 30). A bioaugmentação com *Rhodococcus rhodochrous* TRN7, uma linhagem autóctone, mostrou ser eficiente apenas quando é utilizada em conjunto com a bioestimulação. Essa e outras espécies bacterianas do gênero *Rhodococcus* são conhecidas por sua capacidade de degradar e possibilitar, através de co-metabolismo, que outras bactérias degradem hidrocarbonetos e, portanto, apresentam potencial para serem aplicadas em processos de biorremediação (31–33).

Temporalmente, foram observados três picos de taxas de emissão de CO<sub>2</sub> (Figura 10) ao longo do experimento de biorremediação. O primeiro pico ocorre até o quarto dia, supostamente decorrente de uma etapa inicial de crescimento das populações microbianas, juntamente com o catabolismo da matéria orgânica mais lábil (incluindo alguns hidrocarbonetos) presente nos microcosmos. Os picos seguintes provavelmente são resultado de uma adaptação da microbiota às condições locais. O segundo pico respiratório, que ocorre entre o 10 ° e 16 ° dias, pode ser considerado resultado da degradação de hidrocarbonetos menos recalcitrantes se comparados aos hidrocarbonetos catabolizados em uma etapa caracterizada pela ocorrência do terceiro pico, que tem início no 17 ° dia, e vai reduzindo gradualmente no decorrer do tempo. A redução lenta e gradual após o terceiro pico mostra a capacidade de poucas populações ainda conseguirem metabolizar os compostos mais recalcitrantes, até um momento em que a taxa de liberação de CO<sub>2</sub> chega a valores próximos a zero. Essas variações são especialmente caracterizadas nas simulações onde houve bioestimulação com biosurfactante, KNO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, juntamente com a bioaugmentação, ou apenas a bioestimulação sem a bioaugmentação (Figura 10 A).

A maior efetividade da combinação de metodologias (bioestimulação e bioaugmentação) para biorremediar ambientes marinhos contaminados por petróleo já mostrou ser bem sucedida (34) e nosso trabalho mostrou que a aplicação conjunta dessas técnicas também é eficiente para biorremediar o litoral da Ilha da Trindade.

Em conclusão, nosso trabalho mostrou que a comunidade bacteriana que coloniza a superfície do petróleo após esse contaminante entrar em contato com águas oceânicas é muito dinâmica. Na comunidade que se estabelece na superfície do óleo, o domínio *Bacteria* é o mais diverso, quando comparado com *Archaea* e fungos. A

riqueza de espécies bacterianas aderidas ao óleo aumenta ao longo dos 30 primeiros dias de contaminação, revelando que, durante esse período, a comunidade ainda está se adaptando às novas condições locais. Finalmente, dentre as estratégias de biorremediação simuladas, a bioestimulação, utilizando biossurfactante,  $\text{KNO}_3$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , juntamente com a bioaugmentação, mostrou ser a melhor estratégia para auxiliar na remoção de hidrocarbonetos do petróleo no caso de uma contaminação ocorrer nos arredores da Ilha da Trindade. A complexidade de cada ambiente dificulta a padronização de uma melhor metodologia de biorremediação generalizada, mas assim como nos arredores da Ilha da Trindade, essa metodologia pode ser utilizada em avaliações futuras para se verificar a sua eficácia nas adjacências de outras ilhas oceânicas tropicais.

### 3.5. REFERÊNCIAS

1. **Grigalunas TA, Anderson RC, Brown GM, Congar R, Meade NF, Sorensen PE.** 1986. Estimating the Cost of Oil Spills: Lessons from the Amoco Cadiz Incident. *Mar. Resour. Econ.* **2**:239–263.
2. **Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE, Irons DB.** 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* **302**:2082–6.
3. **Lotze HK, Lenihan HS, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke RG, Kay MC, Kidwell SM, Kirby MX, Peterson CH, Jackson JBC, Bay M.** 2006. Depletion, Degradation, and Recovery Potential of Estuaries and Coastal Seas. *Science* (80-. ). **312**:1806–1809.
4. **Tate PT, Shin WS, Pardue JH, Jackson WA.** 2011. Bioremediation of an Experimental Oil Spill in a Coastal Louisiana Salt Marsh. *Water, Air, Soil Pollut.* **223**:1115–1123.
5. **Bao M-T, Wang L-N, Sun P-Y, Cao L-X, Zou J, Li Y-M.** 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*
6. **Khan FI, Husain T, Hejazi R.** 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* **71**:95–122.
7. **Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:63–70.

8. **Murado MA, Vázquez JA, Rial D, Beiras R.** 2011. Dose-response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. *J. Hazard. Mater.* **185**:807–17.
9. **Atlas RM.** 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45**:180–209.
10. **Miller RM, Singer GM, Rosen JD, Bartha R.** 1988. Photolysis primes biodegradation of benzo[a]pyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1724–30.
11. **Leahy JG, Colwell RR.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**:305–15.
12. **Habe H, Omori T.** 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**:225–43.
13. **El Fantroussi S, Agathos SN.** 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:268–75.
14. **Yu KSH, Wong a HY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY.** 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **51**:1071–7.
15. **Iwamoto T, Nasu M.** 2001. Current bioremediation practice and perspective. *J. Biosci. Bioeng.* **92**:1–8.
16. **Zhu L, Yang X, Xue C, Chen Y, Qu L, Lu W.** 2012. Enhanced rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process. *Bioresour. Technol.* **117**:208–13.
17. **Pansiripat S, Pornsunthorntawee O, Rujiravanit R, Kitiyanan B, Somboonthanate P, Chavadej S.** 2010. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio. *Biochem. Eng. J.* **49**:185–191.
18. **Zhang Y, Miller RM.** 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3276–82.
19. **Almeida A, Moreira L, Bruno S, Thomé J, Martins A, Bolten A, Bjorndal K.** 2011. Green turtle nesting on Trindade Island, Brazil: abundance, trends, and biometrics. *Endanger. Species Res.* **14**:193–201.
20. **Zahed MA, Aziz HA, Isa MH, Mohajeri L, Mohajeri S.** 2010. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresour. Technol.* **101**:9455–60.
21. **Brakstad OG, Lødeng AGG.** 2005. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb. Ecol.* **49**:94–103.

22. **Hommel RK.** 1990. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biosurfactants in hydrocarbon utilization*. *Biodegradation* **1**:107–19.
23. **Sikkema J, de Bont JA, Poolman B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**:201–22.
24. **Floodgate GD.** Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology.
25. **Prince RC.** 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **19**:217–42.
26. **Coulon F, Pelletier E, Gourhant L, Delille D.** 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere* **58**:1439–48.
27. **Nikolopoulou M, Kalogerakis N.** 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Mar. Pollut. Bull.* **56**:1855–61.
28. **Venosa AD, Campo P, Suidan MT.** 2010. Biodegradability of lingering crude oil 19 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ. Sci. Technol.* **44**:7613–21.
29. **Atlas RM, Bartha R.** 1972. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. *Biotechnol. Bioeng.* **14**:309–18.
30. **Sundareshwar PV, Morris JT, Koepfler EK, Fornwalt B.** 2003. Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science* **299**:563–5.
31. **Arif NM, Ahmad SA, Syed MA, Shukor MY.** 2013. Isolation and characterization of a phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain AQ5NOL 2 KCTC 11961BP. *J. Basic Microbiol.* **53**:9–19.
32. **Deeb RA, Alvarez-Cohen L.** 1999. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**:526–36.
33. **Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M, Harayama S.** 2002. Extracellular Polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 Stimulate the Degradation of Aromatic Components in Crude Oil by Indigenous Marine Bacteria Extracellular Polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 Stimulate the Degradation of Aromatic Com. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2337–2343.
34. **Nikolopoulou M, Pasadakis N, Kalogerakis N.** 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* **72**:165–73.

## CONCLUSÕES

A prospecção de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo pode ser realizada em ambientes que não possuem registros de contaminação por estes compostos. A microbiota indígena é capaz de degradar desde hidrocarbonetos de cadeias carbônicas curtas até hidrocarbonetos com moléculas estruturalmente mais complexas e com grande número de átomos de carbono. Microrganismos isolados destes ambientes podem ser aplicados em processos de biorremediação quando aplica-se a metodologia de bioaugmentação.

A microbiota do entorno da Ilha da Trindade, ambiente sem registros de contaminação por hidrocarbonetos do petróleo, possui a capacidade enzimática de metabolizar estes hidrocarbonetos e auxiliar na remoção do contaminante do meio. Quando as condições físico-químicas do meio não propiciam as concentrações de nutrientes necessárias para que a microbiota indígena possa se desenvolver utilizando os hidrocarbonetos como fonte de carbono, é possível utilizar com sucesso a bioestimulação, ao adicionar fontes de nitrogênio e fósforo e também biossurfactante no meio. A remoção dos hidrocarbonetos pode ser ainda mais eficaz quando a bioaugmentação, utilizando espécies indígenas seja aplicada juntamente com a bioestimulação.

A diversidade microbiana capaz de colonizar o petróleo após seu derramamento no oceano é bastante dinâmica, sendo que o domínio *Bacteria* apresenta-se como o mais diverso durante pelo menos 30 dias de exposição do óleo no ambiente.