

BEATRIZ MIDORI TAKAGAKI

**EMULSÕES DUPLAS COMO AGENTES DE BIORREMEDIAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM ÁGUA MARINHA**

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*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientadores: Edmo Montes Rodrigues
Victor Satler Pylro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T136e
2021 Takagaki, Beatriz Midori, 1997-
Emulsões duplas como agentes de biorremediação de
hidrocarbonetos de petróleo em água marinha / Beatriz Midori
Takagaki. – Viçosa, MG, 2021.
39 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 35-39.

1. Petróleo. 2. Bactérias hidrocarbonoclásticas.
3. Biocarvão. 4. Biodegradação. 5. Biossurfactantes.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 665.5

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

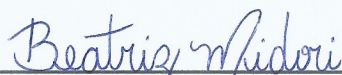
BEATRIZ MIDORI TAKAGAKI

**EMULSÕES DUPLAS COMO AGENTES DE BIORREMEDIAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM ÁGUA MARINHA**

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: 18 de maio de 2021

Assentimento:



Beatriz Midori Takagaki
Autora



Marcos Rogério Tótola
Orientador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a meus pais, por me inspirarem e por terem me proporcionado uma boa qualidade de educação para que eu pudesse chegar até aqui. À minha irmã que, apesar das poucas palavras trocadas e às vezes pela encheção de saco, em determinados momentos em que precisamos nos ajudamos. À minha tia Tomoe, que mesmo com todos seus problemas, até o último dia que pudeste me motivando nesse final de mestrado tão intenso, e sempre nos contagiando com seu sorriso.

Ao meu orientador Marcos Rogério Tótola, por ter aceitado o desafio em me orientar, me auxiliar sempre que possível nas dificuldades encontradas no laboratório e ter me apoiado e ensinado com muita paciência tudo que aprendi durante esses anos e mesmo na pandemia tentando nos animar.

A todo pessoal que conheci em São Gabriel e com quem ainda tenho o privilégio de conversar e torcemos uns pelos outros, principalmente ao Anderson, que sempre me dá uns *helps* na bioinformática e na vida, ao Hudson pelos sempre bons conselhos e ao Luiz que mesmo não me orientando mais, está sempre por perto quando eu preciso, disposto a ajudar e me "jogando" pra frente, nunca me deixando desistir.

Apesar de não ter feito muitas amizades em Viçosa, agradeço enormemente a todos que conheci, foram vivências muito gratificantes e isso que é importante (não esperava menos dos mineiros). Aprendi muito com cada um e, além do pessoal todo do laboratório sempre dispostos a ajudar, o que mais me marcou foi o grupo da Panelinha de Krebs: Thete, Pampam, Jeje, Keykey, Tataly, Cocoly e Lelé. Sem vocês o mestrado não seria o mesmo. infelizmente nos separamos por causa da pandemia, mas sempre terei uma consideração enorme por cada uma de vocês pra sempre, por tudo que passamos juntas, tempos difíceis de sofrimentos, de alegrias e, claro, pela companhia e os almoços da panelinha.

Ao Gabriel, que apesar de nossas diferenças, nos demos tão bem, sempre nos fortalecendo, cuidando um do outro e cada dia mais unidos. Ajudou-me a enfrentar difíceis momentos nessa pandemia e, com suas brincadeiras e excelentes dotes culinários trouxe mais diversão à minha vida.

Ao Departamento de Dança, aos colegas e aos incríveis professores: Gabrielly, Ronaldo, Lara que sempre prepararam uma excelente aula e mesmo

sempre naquele horário não tão usual do almoço, me deram a enorme oportunidade de poder desfrutar dessa arte maravilhosa, me divertindo e distraíndo em meio às correrias do dia a dia.

Ao meu coorientador Edmo que, apesar de mal nos conhecermos, sempre esteve à disposição para sanar quaisquer dúvidas e me ajudar da melhor forma possível. Ao Alex, técnico do laboratório, outro indivíduo indispensável para a minha formação e para todos do laboratório, sempre muito prestativo, paciente e humilde, uma das melhores pessoas que já conheci.

À República Seis no Quarto (Giovanas, Jéssica, Maria Clara, Sarah e Ana) que me acolheu durante o maior tempo do meu período do mestrado, pelos ótimos momentos de descontração (com jogos, fofocas, desabafos). Infelizmente a pandemia nos separou também e cada uma seguiu seu rumo, mas tenho certeza que todas terão muito sucesso. E, à Laura, minha nova companheira de apê, que me resgatou em meio à solidão da pandemia, a não bióloga que abraça e fala com as árvores, apesar de não conseguir manter suas mudas vivas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, por me darem a oportunidade de estar aqui inteirando e acrescentando meu conhecimento e ao CNPq, pela concessão da bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos os citados diretamente ou indiretamente, meu muito obrigada!

“Se você quer os acertos, esteja preparado para os erros.”

(Carl Yastrzemski)

RESUMO

TAKAGAKI, Beatriz Midori, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Emulsões duplas como agentes de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em água marinha.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Edmo Montes Rodrigues e Victor Satler Pylro.

As atividades relacionadas à exploração, transporte e refino do petróleo geram impactos ambientais, com destaque para a ocorrência de derramamentos e consequente contaminação de ambientes aquáticos e terrestres. Dada à lenta degradação natural de grande parte das moléculas constituintes do petróleo, torna-se necessária a adoção de medidas de remediação nos locais contaminados. Este trabalho descreve a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em água marinha litorânea em resposta à aplicação de emulsões duplas de diferentes composições. Foram preparadas emulsões duplas água/óleo/água (A/O/A) utilizando-se óleo Canola como componente principal da fase oleosa e dois surfactantes (polirricinoleato de poliglicerol e coco glicosídeo) nas interfaces das emulsões. Dependendo do tratamento, foram adicionados à composição básica acima biocarvão, sais contendo fontes de nitrogênio e fósforo, uma linhagem de *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA produtora de surfactina e/ou dois isolados de bactérias previamente classificadas como hidrocarbonoclásticas (*Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1). Os tratamentos constituídos de água marinha litorânea contaminada com petróleo e diferentes formulações das emulsões foram incubados em microcosmos de vidro e, semanalmente, quantificou-se a liberação de CO₂, utilizada como indicador da biodegradação. O tratamento contendo a emulsão fertilizada (238 mg L⁻¹ NH₄NO₃-N; 23,8 mg L⁻¹ K₂HPO₄-P na fase aquosa interna) e as duas bactérias hidrocarbonoclásticas propiciou a maior biodegradação do petróleo. A redução ou aumento da concentração dos nutrientes na fase interna resultou em menor biodegradação, assim como a adição de biocarvão ou da linhagem de *B. subtilis* produtora de surfactina à formulação. Conclui-se que a utilização de emulsões duplas contendo nutrientes e as bactérias hidrocarbonoclásticas *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1 favorece a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos. Além disso, a adição de biocarvão ou de linhagem produtora de biosurfactante à formulação não melhora seu efeito bioestimulante.

Palavras-chave: Bactérias hidrocarbonoclásticas. Biocarvão. Biodegradação. Biossurfactante.

ABSTRACT

TAKAGAKI, Beatriz Midori, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Double emulsions as bioremediation agents of petroleum hydrocarbons in seawater.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Edmo Montes Rodrigues and Victor Satler Pylro.

The activities related to oil exploration, transportation and refining generate environmental impacts, with emphasis on the occurrence of spills and the consequent contamination of aquatic and terrestrial environments. Given the slow natural degradation of most of the constituent molecules of oil, it is necessary to adopt remedial measures in these contaminated sites. This work describes the biodegradation of petroleum hydrocarbons in coastal seawater in response to double emulsions of different compositions. Double emulsions water/oil/water (W/O/W) were prepared using Canola oil as the main component in the oil phase, and two surfactants (polyglycerol polyricinoleate and coconut glucoside) at the emulsion interfaces. Depending on the treatment, biochar, salts containing nitrogen and phosphorus, the surfactin-producer *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA and/or two bacteria previously classified as hydrocarbonoclastic (*Rhodococcus rhodochrous* TRN7 and *Nocardia farcinica* TRH1) were added to the basic composition. The treatments consisting of coastal marine water contaminated with oil and the different formulations of the emulsions were incubated in glass microcosms. CO₂ released from the microbial mineralization of organic molecules was quantified weekly and used as indicator of biodegradation. The treatment containing the fertilized emulsion (238 mg L⁻¹ NH₄NO₃-N; 23.8 mg L⁻¹ K₂HPO₄-P in the internal aqueous phase) and the two hydrocarbonoclastic bacteria provided the greatest biodegradation of the oil. The decrease or increase in the concentration of nutrients within the internal phase resulted in less biodegradation, as well as the addition of biochar or the surfactin-producing *B. subtilis* strain to the formulation. It is concluded that the use of double emulsions containing nutrients and the hydrocarbonoclastic bacteria *R. rhodochrous* TRN7 and *N. farcinica* TRH1 favors the biodegradation of petroleum hydrocarbons in marine environments. In addition, the addition of biochar or a biosurfactant-producing strain to the formulation does not improve its bioestimulating effect.

Keywords: Biochar. Biodegradation. Biosurfactant. Hydrocarbonoclastic bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frascos preparados simulando microcosmos de ambiente aquático para quantificar atividade respiratória microbiana em resposta à adição de petróleo e de diferentes formulações de emulsões duplas.22

Figura 2 - Micrografias ópticas do biocarvão de eucalipto. As observações foram feitas na objetiva de 40x.....25

Figura 3 - Emulsões W/O/W fertilizadas produzidas para utilização em ensaio de biorremediação de óleo em água marinha litorânea. **(A)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 40X, imediatamente após sua preparação. **(B)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 4X, imediatamente após sua preparação. **(C)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 4X, após 84 dias da sua preparação. **(D)** emulsão dupla fertilizada contendo biocarvão, vista na objetiva de 4X, após 109 dias da sua preparação.26

Figura 4 - Dióxido de carbono acumulado durante 109 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação usando emulsões A/O/A com diferentes composições. Tratamento 1: água marinha; tratamento 2: água marinha + emulsão não fertilizada; tratamento 3: água marinha + emulsão fertilizada; tratamento 4: água marinha + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 5: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada; tratamento 6: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 7: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão; tratamento 8: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1); tratamento 9: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 10: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (0,5X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 11: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (1X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 12: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (2X de nutrientes) +

biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1) + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.....27

Figura 5 - Dióxido de carbono acumulado **(A)** após 63 dias e **(B)** após 109 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação usando emulsões A/O/A com diferentes composições. Médias com as mesmas letra não diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1: água marinha; tratamento 2: água marinha + emulsão não fertilizada; tratamento 3: água marinha + emulsão fertilizada; tratamento 4: água marinha + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 5: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada; tratamento 6: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 7: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão; tratamento 8: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1); tratamento 9: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 10: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (0,5X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 11: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (1X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 12: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (2X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1) + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos empregados na montagem dos microcosmos para avaliação da eficiência das emulsões em estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo em água oceânica.	23
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	Acidentes com petróleo em ecossistemas aquáticos	15
2.2.	Biorremediação.....	15
2.3.	Estratégias para se potencializar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes aquáticos	16
2.3.1.	Emulsões	16
2.3.2.	Biossurfactantes	17
2.3.3.	Biocarvão.....	18
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.	Água	19
3.2.	Preparo das emulsões.....	19
3.3.	Inoculantes microbianos	20
3.4.	Estabilidade das emulsões A ₁ /O/A ₂	20
3.5.	Produção e análise do biocarvão.....	21
3.6.	Preparo dos microcosmos e avaliação do efeito das emulsões sobre a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo.....	21
3.7.	Crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> LBBMA RI4914 IsrfA em meio simulando a dupla emulsão fertilizada.....	24
3.8.	Análises estatísticas	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.	Características do biocarvão	25
4.2.	Características e estabilidade das emulsões.....	25
4.3.	Efeito das emulsões duplas na biodegradação do petróleo	27
5.	CONCLUSÃO	34
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é um combustível fóssil constituído principalmente por hidrocarbonetos. Essas cadeias de hidrocarbonetos possuem diferentes tamanhos, o que possibilita a obtenção de diversos produtos como butano, asfalto, combustíveis automobilísticos, dentre outros. Essa diversidade de produtos obtidos do petróleo faz com que as explorações petrolíferas possuam alto valor econômico agregado. No entanto, toda a cadeia do petróleo, desde a extração até o transporte e refino gera impactos ambientais, sociais, econômicos e políticos (KUPPUSAMY et al., 2020; MORITA et al., 1999; SOUZA; FREITAS, 2002).

Em razão dos desastres ambientais envolvendo o petróleo ocorridos em todo mundo, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de se minimizarem os impactos ambientais gerados. Técnicas baseadas na biorremediação são especialmente atrativas, uma vez que tendem a gerar produtos inócuos, são de baixo custo (comparativamente a métodos físicos e/ou químicos de remediação), contribuem para acelerar a degradação dos compostos tóxicos (BARKER; BRYSON, 2002) e ainda podem ser aplicadas tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres.

A utilização de biocarvão, biossurfactantes e emulsões também têm se mostrado opções promissoras para acelerar a eliminação de compostos indesejáveis em diversos ambientes. O biocarvão tem capacidade de sorção de contaminantes (SHAKOOR et al., 2020). Biossurfactantes atuam diminuindo a tensão interfacial entre poluentes hidrofóbicos e a água, facilitando com isso a sua solubilização e consequente absorção por microrganismos com capacidade de metabolizar os poluentes (CAROLIN C; KUMAR; NGUEAGNI, 2021). Por fim, as emulsões, possibilitam uma liberação gradual de compostos e princípios ativos (MUSCHIOLIK; DICKINSON, 2017) de interesse, os quais visam acelerar a atividade de biodegradação dos poluentes por microrganismos.

Estratégias baseadas na utilização dos materiais acima mencionados, dentre outros, podem potencializar o efeito de um determinado tratamento ou até mesmo substituir outras técnicas comumente utilizadas para remediação de ambientes contaminados com moléculas orgânicas e que não são tão eficazes (BAO et al., 2012; CHANDRA et al., 2013).

Tendo em vista as limitações das técnicas de remediação de ambientes contaminados com petróleo atualmente disponíveis, neste trabalho, avaliou-se a

capacidade de emulsões duplas de estimularem a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em água marinha litorânea. Fatores como concentração de nutrientes minerais na fase aquosa interna, presença de biocarvão, de uma linhagem de *B. subtilis* produtora de surfactina e de duas linhagens bacterianas hidrocarbonoclasticas (*Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1) e seus efeitos sobre a capacidade das emulsões estimularem a biodegradação também foram objeto do estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Acidentes com petróleo em ecossistemas aquáticos

O derramamento de petróleo nos ambientes aquáticos é um problema relativamente frequente e muito grave. No entanto, a despeito do aumento do comércio do petróleo nos últimos anos, os acidentes com derramamento têm diminuído em decorrência do maior rigor das agências regulatórias e da modernização dos navios petroleiros (CHEN et al., 2019). Ainda assim, episódios de acidentes petrolíferos continuam a ocorrer sendo um problema ainda maior quando atinge locais mais vulneráveis, com riqueza de espécies que podem ser endêmica (MAGRIS; GIARRIZZO, 2020).

O petróleo, em contato com a água do mar, leva à redução da concentração de oxigênio dissolvido na água, dado o aumento da matéria orgânica e, ainda, dificulta a passagem de luz necessária a organismos fotoautotróficos, base das cadeias alimentares e principais responsáveis pela introdução de oxigênio molecular nos ambientes aquáticos (ONWURAH et al., 2007). Além disso, quando em contato com a fauna marinha, pode causar deformidades em peixes, bloquear o sistema respiratório dos animais, prejudicar o voo de aves, já que o petróleo acaba aderindo em suas penas, dificultando também seu equilíbrio térmico e tornando-as susceptíveis à intoxicação pela deglutição do óleo no momento do *preening* (CHEN et al., 2019; FRY; LOWENSTINE, 1985). Já em humanos, o contato com hidrocarbonetos de petróleo pode resultar em problemas de pele, como irritações, intoxicações, até efeitos neurológicos e carcinogênicos (CARMO et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2020).

2.2. Biorremediação

Na tentativa de se contornarem os desastres ambientais envolvendo o derramamento de petróleo, diversas tecnologias têm sido objeto de estudo para o tratamento desse contaminante ambiental, além daquelas cujo foco é evitar ou reduzir seu espalhamento. Após o maior incidente na América do Norte, em março de 1989, no qual o navio Exxon Valdez despejou aproximadamente 43 mil m³ de óleo cru no mar do Alasca (SHORT, 2017), muitos estudos começaram a ser feitos e uma das estratégias empregadas para se acelerar a degradação do petróleo foi a utilização de biorremediação por meio da bioestimulação (PRITCHARD et al., 1992).

A biorremediação é uma técnica de remediação ambiental baseada na utilização de organismos vivos ou produtos do seu metabolismo cujo principal objetivo é diminuir ou eliminar contaminantes ambientais (VIDALI, 2001). A título de exemplo, diversos microrganismos possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono e energia, degradando-os e gerando células microbianas, compostos orgânicos mais simples e geralmente inócuos, além de água e CO₂ (PÉREZ SILVA et al., 2006; VIDALI, 2001; YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007).

Há duas técnicas principais de biorremediação em ambientes contaminados com petróleo baseadas na atividade microbiana: bioestimulação e bioaumentação. A primeira baseia na eliminação ou diminuição dos efeitos de fatores que estão limitando o crescimento e metabolismo das populações microbianas responsáveis pela biodegradação do contaminante (ŁAWNICZAK et al., 2020). Já a segunda consiste na introdução de uma microbiota previamente caracterizada como possuindo elevado potencial de biodegradação dos contaminantes-alvo (ŁAWNICZAK et al., 2020). Essa última pressupõe que, no ambiente contaminado, não ocorrem, naturalmente, microrganismos com capacidade de biodegradação dos contaminantes em taxas compatíveis com a necessidade de remediação do local.

2.3. Estratégias para se potencializar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes aquáticos

2.3.1. Emulsões

O crescimento e o metabolismo microbianos em ambientes oligotróficos são geralmente limitados, o que resulta em baixa taxa de decomposição da matéria orgânica, incluindo contaminantes ambientais. Nessas circunstâncias, uma das formas de se acelerar a atividade de biodegradação consiste no aporte de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, que em geral são os principais limitantes do crescimento microbiano em ecossistemas aquáticos e terrestres (BRAGG et al., 1994; GERTLER et al., 2012; ORANTAS, 2013; WARR et al., 2013).

A aplicação de nutrientes solúveis em ambientes aquáticos, especialmente em ambientes marinhos, não é efetiva, uma vez que os nutrientes tendem a se dissipar no ambiente (WARR et al., 2013). Uma forma de se concentrar e controlar a liberação desses nutrientes é aprisioná-los em uma emulsão (BIBETTE;

CALDERON; POULIN, 1999; PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015; RODRIGUES et al., 2020).

Emulsões simples podem ser compostas por gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa (O/A) ou por gotas de água dispersas em uma fase oleosa (A/O) (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). Já as emulsões múltiplas caracterizam-se pela presença de gotículas de óleo contendo uma fase aquosa interna e dispersas em uma fase aquosa externa (A/O/A), ou gotículas de água contendo uma fase oleosa interna e dispersas em uma fase oleosa externa (O/A/O) (PEREIRA; GARCIA-ROJAS, 2015). Essas emulsões tendem a ser termodinamicamente muito instáveis, tendendo a coalescer ou flocular. Por isso, fatores como o tipo de surfactante utilizado para manter as fases, equilíbrio osmótico entre fase interna e externa, proporção de emulsão dispersa na fase contínua e natureza dos encapsulantes são importantes para se manter a estabilidade por mais tempo (CHOUDHARY; SABIKHI, 2021).

No caso de emulsões duplas, é necessária a presença de dois tipos de surfactantes com diferentes valores de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), um mais elevado e outro mais baixo, para manter cada interface da emulsão (BIBETTE; CALDERON; POULIN, 1999). O EHL representa a solubilidade em óleo e água de um emulsificante (PREMLAL RANJITH; WIJEWARDENE, 2006), cujos valores variam de 0 a 20 (KRALOVA; SJÖBLOM, 2009). Surfactantes com EHL na faixa de 3,5 a 6,0 são mais adequados para uso em emulsões A/O; já os surfactantes com EHL na faixa de 8 a 18 são geralmente usados em emulsões O/A (GRIFFIN, 1949).

2.3.2. Biosurfactantes

Algumas espécies microbianas podem não ser capazes de degradar os constituintes do petróleo, mas podem contribuir com o processo de biodegradação dessas moléculas hidrofóbicas por meio da produção de biosurfactantes.

Biosurfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial e interfacial, o que aumenta a área de superfície de fases imiscíveis e, assim, a miscibilidade da água com substâncias hidrofóbicas (RAHMAN; GAKPE, 2008). No caso dessas moléculas hidrofóbicas serem contaminantes ambientais, o aumento de sua solubilidade em água favorece sua biodegradação, em razão do aumento de sua biodisponibilidade (CAMEOTRA; BOLLAG, 2003; CAMEOTRA; MAKKAR, 2010; HALECKÝ; KOZLIAK, 2020; SOUZA; VESSONI-PENNA; DE SOUZA OLIVEIRA,

2014). Em geral, os biossurfactantes são preferidos a surfactantes sintéticos por possuírem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodigestibilidade (SOUZA; VESSONI-PENNA; DE SOUZA OLIVEIRA, 2014).

A surfactina é um dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus* spp. Foi um dos primeiros lipopeptídeos descritos. A surfactina é sintetizada por uma via não ribossômica e os genes diretamente envolvidos com sua síntese estão localizados no operon *srfA* (JACQUES, 2011; NAKANO et al., 1991). Por ser um dos primeiros lipopeptídeos descritos e por apresentar uma alta atividade de superfície, é amplamente estudado, incluindo a sua ação na biodegradação de xenobióticos e hidrocarbonetos de petróleo (LAI et al., 2009; WHANG et al., 2009).

2.3.3. Biocarvão

O biocarvão é um material que vem sendo estudado para aumentar a eficiência de biodegradação de poluentes orgânicos. Apresenta baixo custo de produção (ZHANG et al., 2016), podendo ser originado a partir da decomposição térmica de diferentes matérias-primas. Fatores como tempo e temperatura empregados no processo de fabricação são determinantes de suas características finais, como área de superfície, volume, hidrofobicidade e tamanho dos poros (GRAY et al., 2014; NOYCE et al., 2016; THIES; RILLIG, 2009; ZHAO et al., 2013). Apesar de ter sido mais explorado como um condicionante de solos (KONG et al., 2018; TANG et al., 2013; ZHU et al., 2017), estudos recentes propõem a utilização do biocarvão para adsorção de poluentes, como hidrocarbonetos do petróleo (KANDANELLI et al., 2018). Isso permite a concentração desses poluentes na superfície do biocarvão, facilitando com isso sua biodegradação (ZHANG et al., 2016) principalmente dos hidrocarbonetos de baixo peso molecular (KONG et al., 2018). A adsorção dos hidrocarbonetos de petróleo a uma superfície, possivelmente proporciona também o enriquecimento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (KONG et al., 2018), já que os poros contidos no biocarvão também fornecem uma espécie de micro-habitat para os microrganismos (NOYCE et al., 2016; THIES; RILLIG, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Água

A água do mar utilizada no experimento “**Preparo dos microcosmos e avaliação do efeito das emulsões sobre a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo**” foi coletada na cidade de Vila Velha - ES (20°26'31.46"S 40°19'43.38"W). A partir da 11ª semana, foi utilizada água do mar artificial produzida seguindo as recomendações de KOK KEE et al. (2015).

3.2. Preparo das emulsões

As emulsões água₁/óleo/água₂ (A₁/O/A₂) foram preparadas em duas fases, conforme descrito por Rodrigues et al. (2020), com algumas adaptações. Brevemente, a emulsão água em óleo (A₁/O) foi preparada misturando-se a fase aquosa interna (A₁) e a fase oleosa na proporção de 2:3 (v:v). Para a preparação da fase aquosa interna (A₁), uma gelatina comestível em pó (sem sabor) (Royal, Pedreira, SP, Brasil), na concentração de 7,5 g L⁻¹, foi hidratada com água marinha. A mistura foi submetida a agitação e aquecimento a 65 °C, até a dissolução e em seguida foram adicionados os sais NH₄NO₃ (680 g L⁻¹, correspondendo a 238 mg L⁻¹ de N) e K₂HPO₄ (133,75 g L⁻¹, correspondendo a 23,8 mg L⁻¹ de P). Essas concentrações representam a concentração 1X. Outras formulações contendo a metade (0,5X) ou o dobro (2X) dessas concentrações foram também avaliadas.

A fase oleosa (O) foi composta por 20 g L⁻¹ de polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) (Dhaymer's Fine Chemicals) dissolvidos em 24 mL de óleo de Canola (na temperatura entre 15 a 30 °C). A união das duas fases A₁/O foi feita por meio de agitação utilizando-se um equipamento Polytron, modelo PCU 11 (Kinematica AG, Littau, Suíça), no nível 3 durante 4 min. A emulsão resultante foi imediatamente resfriada a 4 °C por 1h para solidificação da gelatina e, posteriormente, foi deixada em temperatura ambiente por aproximadamente 1h para melhorar a eficiência da emulsificação.

A fase aquosa externa (A₂) foi preparada dissolvendo-se 8,0 g L⁻¹ de coco glicosídeo (Biotek Fenchem LTD) à água do mar.

Por fim, foram adicionados gradualmente 20% (v/v) da emulsão A₁/O à fase aquosa externa A₂, seguindo-se nova agitação no nível 2 durante 2 min e subsequente resfriamento a 4 °C em banho-maria. Dessa forma, obteve-se uma

emulsão A₁/O contendo 40% de água e 60% de óleo e a dupla emulsão contendo 20% da A₁/O e 80% da A₂.

As emulsões contendo biocarvão (ver item “**Produção e análise do biocarvão**” abaixo) foram preparadas adicionando-se 300 g L⁻¹ do biocarvão à fase aquosa interna (A₁). Emulsões controle foram produzidas sem a adição dos nutrientes inorgânicos à fase aquosa interna. A confirmação da produção das emulsões foi feita por meio da observação em microscópio de campo claro.

3.3. Inoculantes microbianos

Os isolados *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 e *Nocardia farcinica* TRH1, previamente caracterizados como hidrocarbonoclasticos, foram obtidos a partir de biofilmes formados sobre cupons de acrílico contaminados com óleo cru e mantidos na região litorânea da ilha da Trindade (RODRIGUES et al., 2020). O isolado *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA é uma linhagem modificada geneticamente para aumentar a produção da surfactina a partir da expressão de um promotor forte *PgroE* induzido por IPTG (ALMEIDA, 2018).

Os isolados descritos acima foram estocados em uma mistura de caldo peptona de caseína e soja - TSB (Merck, Darmstadt, Alemanha) com glicerol a -80 °C. Os inóculos foram obtidos após o cultivo em caldo nutriente (HiMedia, Mumbai, Índia) a 30 °C e 150 rpm por 48 h (*R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1) ou 24 h (*B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA). As culturas foram centrifugadas e lavadas duas vezes em solução salina estéril para remoção de componentes do meio de cultivo. As células bacterianas foram inoculadas na água do mar (utilizada na preparação da fase A₁), de forma a se obter concentração final de 1,0 x 10⁶ UFC mL⁻¹. Nos tratamentos com a presença de *B. subtilis*, foi adicionado (também na fase A₁) 0,5 mmol L⁻¹ de IPTG para indução do promotor *PgroE*.

3.4. Estabilidade das emulsões A₁/O/A₂

Durante um período de 109 dias foram feitas fotomicrografias sob microscópio óptico de campo claro para se verificar a estabilidade das gotículas de óleo presentes na fase aquosa externa. As emulsões foram armazenadas em tubos cônicos com capacidade para 15 mL, mantidos em temperatura de aproximadamente 22 °C, sob agitação leve em um agitador e homogeneizador basic modelo 3-D K45-4020 Rotation Mixer (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil).

3.5. Produção e análise do biocarvão

O biocarvão foi obtido por meio da pirólise de carvão de eucalipto em um forno mufla microprocessado (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 350 °C por 4 h. Após sofrer o processo de decomposição térmica e antes da utilização, o material foi triturado e passado através de uma peneira de malha 100 (tamanho de partícula <0,150 mm).

O pH do biocarvão foi medido em um pHmetro Digimed DM-20, dispersando-se, sob agitação, 3 g de biocarvão em 10 mL de água ultrapura. O tamanho dos poros foi determinado por microscopia óptica. A densidade das partículas (D_p) foi estimada pelo método do balão volumétrico modificado, proposto por Gubiani; Reinert; Reichert (2006). Esse método consiste basicamente na pesagem de 1 g do biocarvão em balão volumétrico de 10 mL e determinação da massa total (M_{bb}), seguida da adição de cerca de 5 mL de álcool 92,8%. O balão é então agitado manualmente para eliminação do ar contido entre as partículas do biocarvão e, posteriormente, o volume é completado com álcool, medindo-se a seguir a massa do balão com o álcool (M_{bba}). Separadamente, é determinada a densidade do álcool (D_a), dividindo-se a massa de álcool obtida pela pesagem de 10 mL de álcool. A D_a é definida considerando-se o resultado do valor médio de três repetições. A densidade das partículas do biocarvão é obtida por meio da fórmula abaixo:

$$D_p = (M_{bb} - M_b) / [10 - (M_{bba} - M_{bb}) / D_a]$$

onde: D_p = densidade de partículas do biocarvão (g cm^{-3}); M_b = massa do balão volumétrico (g); M_{bb} = massa do balão volumétrico contendo o biocarvão (g); M_{bba} = massa do balão volumétrico contendo biocarvão mais álcool (g); e D_a = densidade do álcool (g cm^{-3}).

As imagens do biocarvão foram obtidas no Microscópio Óptico modelo Eclipse E200MV R (Nikon, Tokyo, Japão), com ampliação de 400x e os poros foram medidos no *software* ImageJ (National Institutes of Health).

3.6. Preparo dos microcosmos e avaliação do efeito das emulsões sobre a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo

Para se avaliar a eficiência das emulsões em estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo em água oceânica, foram montados microcosmos em

frascos de vidro com capacidade de 750 mL contendo 50 mL de água do mar (exceto o tratamento controle). Dentro dos frascos, foram suspensos copos de plástico com capacidade de 50 mL contendo 10 mL de NaOH a 1 mol L^{-1} para captura do CO_2 produzido pela atividade respiratória dos microrganismos decorrentes da oxidação dos substratos orgânicos (Figura 1).



Figura 1 - Frascos preparados simulando microcosmos de ambiente aquático para quantificar atividade respiratória microbiana em resposta à adição de petróleo e de diferentes formulações de emulsões duplas.

Os microcosmos foram montados de acordo com os tratamentos apresentados na Tabela 1. O petróleo, quando presente no tratamento, foi adicionado na proporção de 1% (v/v). Para eliminação dos compostos voláteis, antes de ser adicionado aos frascos, o petróleo foi aquecido de forma gradual até $210 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se uma manta aquecedora (Biomixer). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

Tabela 1 - Tratamentos empregados na montagem dos microcosmos para avaliação da eficiência das emulsões em estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo em água oceânica.

Tratamentos	Composição
0	controle (frasco vazio)
1	água marinha
2	água marinha + emulsão não fertilizada
3	água marinha + emulsão fertilizada
4	água marinha + emulsão fertilizada + consórcio (R+N)*
5	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada
6	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + consórcio (R+N)
7	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão
8	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + consórcio (R+N)
9	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + BS**
10	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (0,5X de nutrientes) + biocarvão + consórcio (R+N) + BS
11	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (1X de nutrientes) + biocarvão + consórcio (R+N) + BS
12	água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (2X de nutrientes) + biocarvão + consórcio (R+N) + BS

* R+N: *Rhodococcus rhodochrous* TRN7 + *Nocardia farcinica* TRH1.

** BS: *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

Os microcosmos permaneceram incubados a 25 °C durante 109 dias. Uma vez por semana foi feita a titulação do NaOH residual para se estimar a quantidade de CO₂ (em mg) produzido, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{mg CO}_2 = (V_B - V_A) * M_{\text{HCl}} * 22$$

onde: V_B é o volume de HCl gasto para titular o controle (mL); V_A é o volume gasto de HCl para titular cada frasco (mL); M_{HCl} é a molaridade do HCl utilizado na titulação (mol L⁻¹) e 22 é o peso equivalente de CO₂.

Após cada titulação, metade do volume da água contida nos frascos era substituída. Essa troca de água do mar foi feita para simular o efeito da dissipação dos nutrientes minerais em água oceânica. A titulação foi feita a partir de 5 mL de NaOH, seguindo recomendações do Comunicado Técnico 99 (EMBRAPA, 2007).

3.7. Crescimento do *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA em meio simulando a dupla emulsão fertilizada

Para verificar o crescimento e produção de surfactina pelo *B. subtilis* nas condições da emulsão, primeiramente a cultura foi crescida como descrito no item 3.3. Após lavagem com água salina estéril, a cultura foi inoculada em frascos de 125 mL contendo 50 mL dos componentes da emulsão (nas mesmas proporções descritas no item 3.2). A DO (densidade óptica) foi ajustada para 0,05 e foram incubados a 30 °C a 150 rpm. Foram feitas 3 repetições com adição de IPTG ao meio e outras 3 repetições sem adição do IPTG ao meio. Foi feito um teste de espalhamento de óleo após 72 h e 96 h de incubação e também foi feito plaqueamento de cada repetição nas diluições entre 10⁻⁵ - 10⁻⁷ para a contagem de colônias.

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R. O teste Kolmogorov–Smirnov foi aplicado para se verificar a normalidade dos dados. Para se verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey com significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características do biocarvão

O pH do biocarvão obtido na pirólise do carvão de eucalipto foi em média 5,7 e a densidade de partículas foi de $0,33 \text{ g cm}^{-3}$.

Observando-se o biocarvão em microscópio de campo claro, foi possível notar um sentido de quebra mais comum do carvão, com a formação de partículas irregulares, alongadas e estreitas. Os poros apresentaram um diâmetro maior médio $4,4 \mu\text{m}$ e um diâmetro menor médio de $2,7 \mu\text{m}$ (Figura 2).

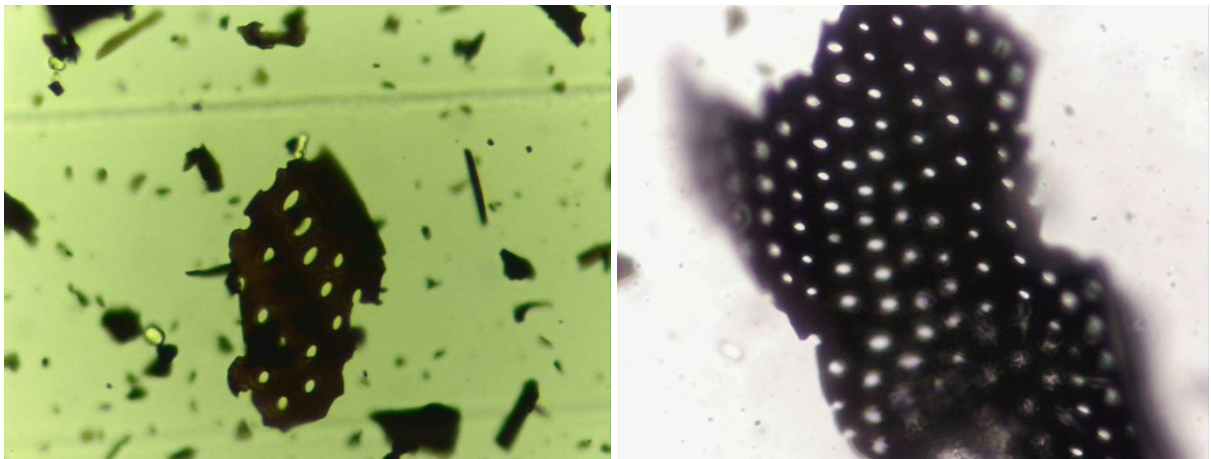


Figura 2 - Micrografias ópticas do biocarvão de eucalipto. As observações foram feitas na objetiva de 40x.

4.2. Características e estabilidade das emulsões

A análise das emulsões ao microscópio óptico demonstrou a presença de gotículas de óleo dispersas na fase aquosa externa (Figura 3), com diâmetro variando entre $1,1$ a $153 \mu\text{m}$. Essas diferenças na dimensão das gotículas de óleo propiciam a liberação dos nutrientes de forma gradual, já que a estabilidade de cada uma tende a ser diferente (RODRIGUES et al., 2020). Desse modo, a captação de nutrientes pelos microrganismos que estejam atuando na biodegradação dos substratos hidrofóbicos aos quais as gotículas de óleo tenham se aderido é potencialmente mantida por um período mais prolongado do que o que seria obtido caso os nutrientes fossem liberados em um curto período de tempo.

A relativa instabilidade das emulsões, especialmente atribuída à tendência das gotículas de óleo de maior diâmetro coalescerem, faz com que percam com o

passar do tempo o formato circular que tinham inicialmente (Fig. 3 A e B) e também com que gotículas de maior diâmetro se formem (Fig. 3C) (RODRIGUES et al., 2020). Analisando-se, contudo, a emulsão contendo biocarvão já com 109 dias desde sua preparação, observa-se que a maior parte das gotículas ainda apresenta formato circular e cujo diâmetro é similar ao observado logo após o preparo (Fig. 3 A e B), indicando que o biocarvão contribui para manter a emulsão estável.

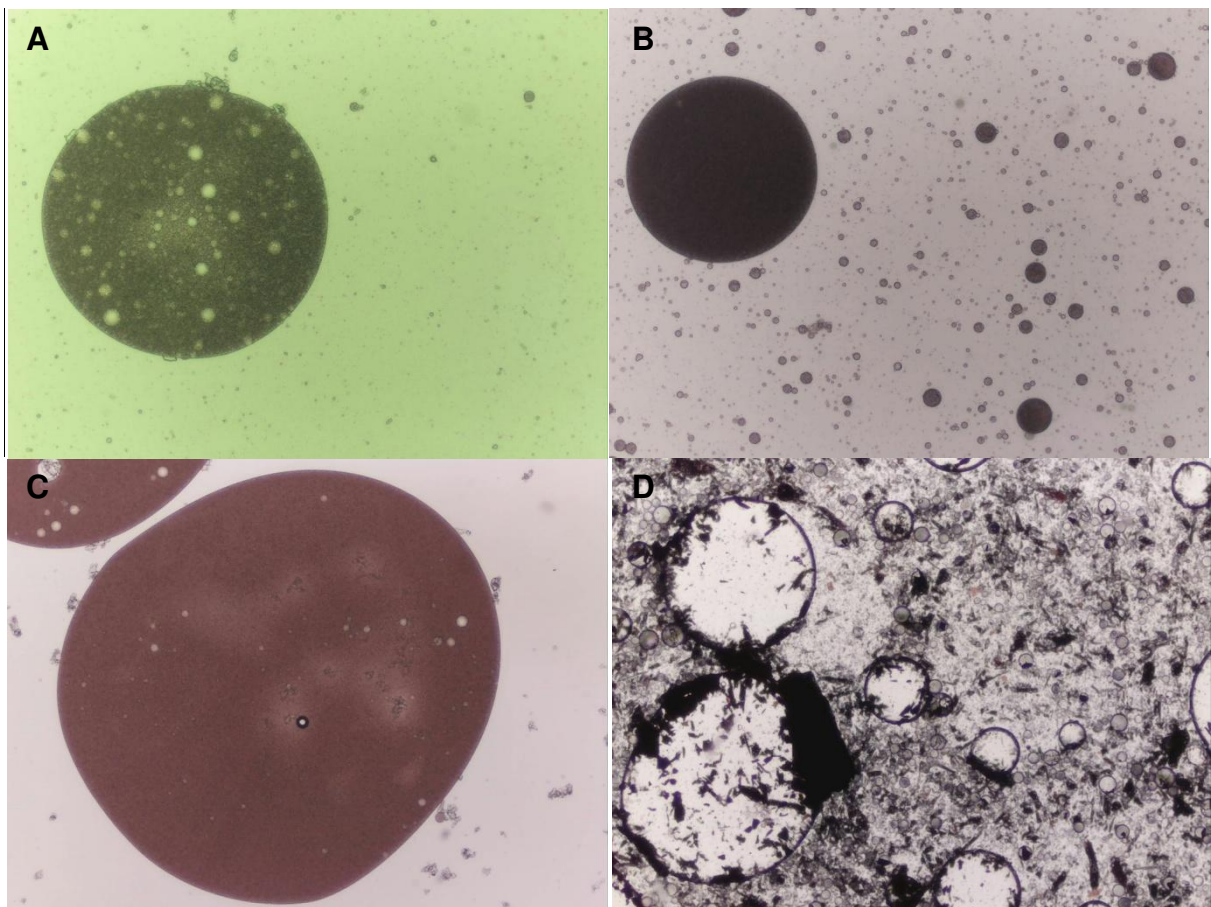


Figura 3 - Emulsões W/O/W fertilizadas produzidas para utilização em ensaio de biorremediação de óleo em água marinha litorânea. **(A)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 40X, imediatamente após sua preparação. **(B)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 4X, imediatamente após sua preparação. **(C)** emulsão dupla fertilizada, vista na objetiva de 4X, após 84 dias da sua preparação. **(D)** emulsão dupla fertilizada contendo biocarvão, vista na objetiva de 4X, após 109 dias da sua preparação.

A coalescência que as gotículas de óleo tendem a sofrer com o tempo resulta na liberação dos materiais contidos na fase aquosa interna. Dada a sua maior

tendência de coalescer, as gotículas maiores são as primeiras a liberarem o material nelas contido, seguindo-se as gotículas menores em ordem decrescente de diâmetro. Esse fenômeno resulta em liberação contínua e gradual dos constituintes da fase aquosa interna. A manutenção da estabilidade das emulsões resulta principalmente da utilização dos surfactantes PGPR e coco glicosídeo. O polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) é um surfactante sintético muito utilizado, por exemplo, na indústria alimentícia e é considerado um emulsificante altamente eficaz para emulsões água/óleo (SU et al., 2006), capaz de prevenir a coalescência das gotículas de água dispersas na fase oleosa (BAHTZ et al., 2016). Já o coco glicosídeo é um surfactante da família dos alquil poliglicosídeos, que previne a coalescência das gotículas de óleo dispersas na fase aquosa externa. Esse surfactante é produzido a partir de diversas matérias-primas renováveis e apresenta alta biodegradabilidade e baixa toxicidade (FRANÇA et al., 2017; MESSINGER et al., 2007).

4.3. Efeito das emulsões duplas na biodegradação do petróleo

Houve ampla diferença na emissão de CO₂ por cada um dos microcosmos estudados ao longo do período de avaliação (Figuras 4 e 5).

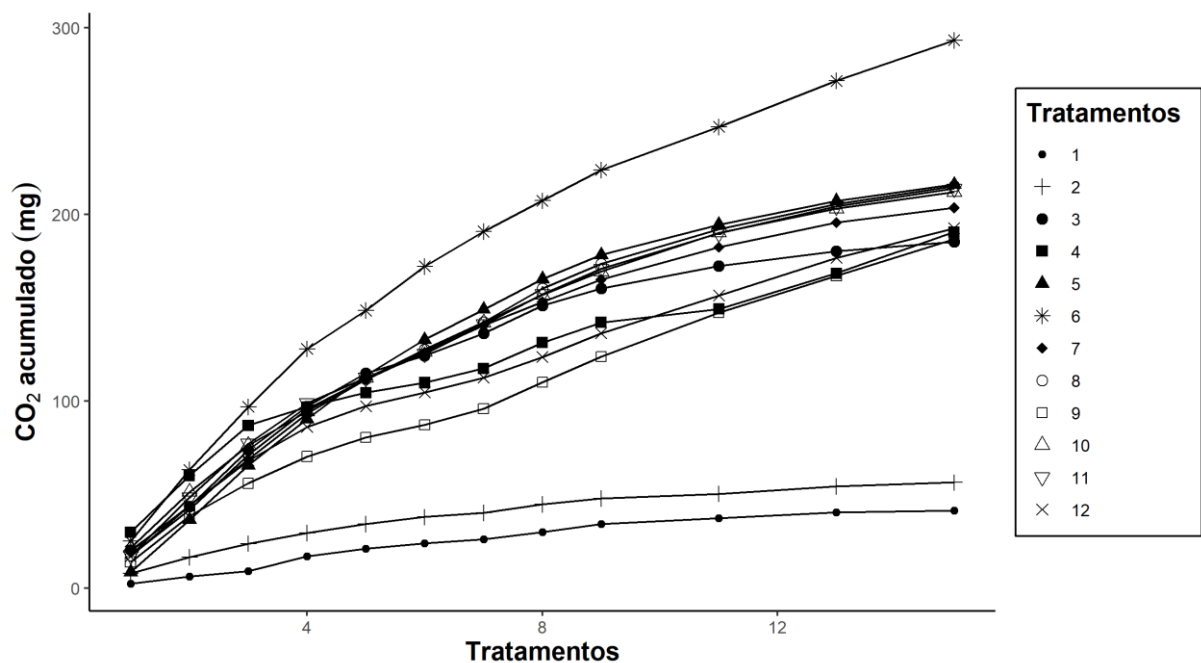


Figura 4 - Dióxido de carbono acumulado durante 109 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação usando emulsões A/O/A com diferentes composições. Tratamento 1: água marinha; tratamento 2: água marinha +

emulsão não fertilizada; tratamento 3: água marinha + emulsão fertilizada; tratamento 4: água marinha + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 5: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada; tratamento 6: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 7: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão; tratamento 8: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1); tratamento 9: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 10: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (0,5X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 11: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (1X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 12: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (2X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1) + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

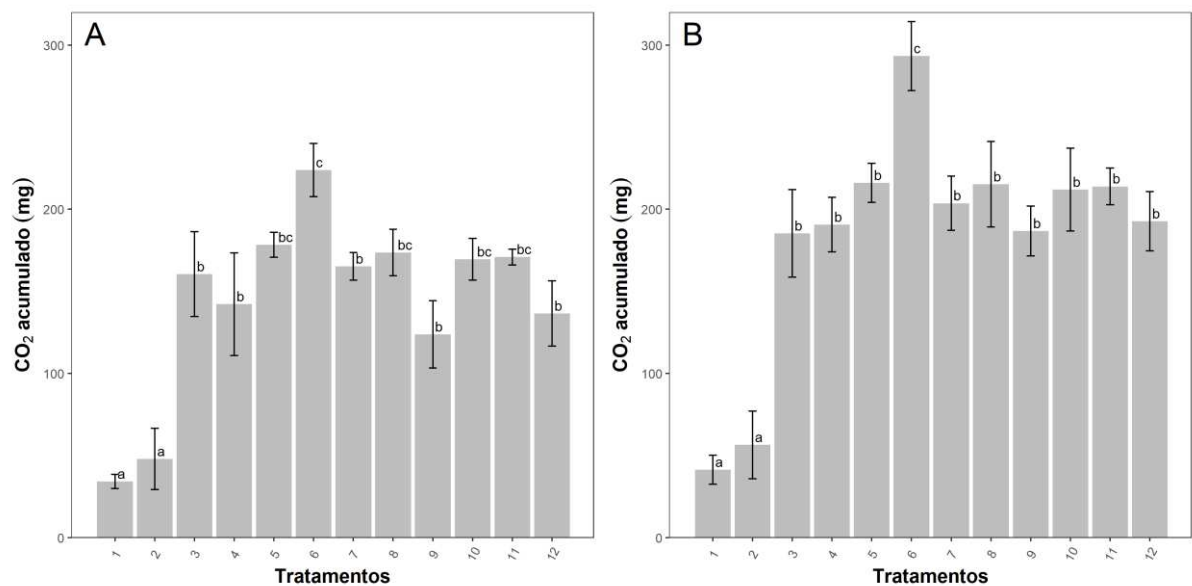


Figura 5 - Dióxido de carbono acumulado **(A)** após 63 dias e **(B)** após 109 dias de incubação dos tratamentos simulando estratégias de biorremediação usando emulsões A/O/A com diferentes composições. Médias com as mesmas letra não diferem entre si pelo teste *post-hoc* de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamento 1: água marinha; tratamento 2: água marinha + emulsão não fertilizada; tratamento 3: água marinha + emulsão fertilizada; tratamento 4: água marinha + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 5: água marinha

+ petróleo + emulsão fertilizada; tratamento 6: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1; tratamento 7: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão; tratamento 8: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1); tratamento 9: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada + biocarvão + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 10: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (0,5X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 11: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (1X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1 + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; tratamento 12: água marinha + petróleo + emulsão fertilizada (2X de nutrientes) + biocarvão + *R. rhodochrous* TRN7 + *N. farcinica* TRH1) + *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA.

A adição da emulsão dupla não fertilizada à água marinha não resultou em aumento significativo da emissão de CO₂, comparativamente ao tratamento contendo somente água (tratamentos 1 e 2, Figura 5). Por outro lado, a incorporação de nutrientes minerais à fase aquosa interna da emulsão promoveu um aumento significativo da atividade respiratória (tratamentos 2 e 3, Fig. 5), o que demonstra que a mineralização de compostos orgânicos pelas populações microbianas heterotróficas autóctones da água utilizada neste trabalho é limitada pela escassez nutricional. Isso decorre da escassez de alguns nutrientes minerais, como nitrogênio, ferro e fósforo já antes relatada principalmente em áreas distantes da zona costeira (RODRIGUES et al., 2020, MCKEW et al., 2007), e agora, demonstrado neste trabalho que essa limitação também ocorre em águas de regiões litorâneas do Espírito Santo.

A adição do consórcio das bactérias hidrocarbonoclásticas *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1 à emulsão fertilizada não teve efeito significativo sobre a atividade de mineralização das moléculas orgânicas presentes na água (tratamentos 3 e 4, Fig. 5), indicando que as populações heterotróficas autóctones são capazes de mineralizar as moléculas orgânicas naturalmente presentes na água, além daquelas que compõem a emulsão (item 3.2).

A adição de petróleo tratado termicamente para eliminação dos hidrocarbonetos de menor tamanho de cadeia (e conseqüentemente mais voláteis), juntamente com a emulsão fertilizada, resultou em pequeno aumento da emissão de

CO₂ (tratamentos 3 e 5, Fig. 5). Por outro lado, quando se incorporou à formulação o consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas, a presença do petróleo na água do microcosmo resultou em aumento significativo da atividade respiratória (tratamentos 4 e 6, Fig. 5), indicando que houve aumento da taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo nesse tratamento.

R. rhodochrous TRN7 e *N. farcinica* TRH1 são isolados bacterianos hidrocarbonoclásticos que possuem alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, desde compostos alifáticos de 8 a 50 átomos de carbono até aromáticos policíclicos mais complexos, como pireno e fenantreno (RODRIGUES; KALKS; TÓTOLA, 2015). Em razão dessa alta eficiência na biodegradação de diferentes frações do petróleo, sua incorporação à formulação da emulsão dupla fertilizada resultou em aumento significativo na atividade de decomposição dos hidrocarbonetos presentes nos microcosmos. Além disso, em decorrência do tratamento térmico do petróleo, restaram as frações de tamanho de cadeia média a alta, que tendem a apresentar maior hidrofobicidade. Além da capacidade intrínseca de degradar diferentes frações do petróleo, *R. rhodochrous* TRN7 e *N. farcinica* TRH1 possuem a capacidade de alterarem a superfície externa de suas células, de modo a se tornarem hidrofóbicas quando crescem a partir de moléculas hidrofóbicas (RODRIGUES et al., 2020). Isso efetivamente faz com que possam ter maior acesso às moléculas de alta hidrofobicidade que compõem o petróleo utilizado neste trabalho.

Destaca-se que, na avaliação realizada após 63 dias de incubação (Fig. 5A), a atividade respiratória no microcosmo contendo petróleo e emulsão fertilizada acrescida do consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas (tratamento 6) não diferiu da obtida no tratamento sem o consórcio (tratamento 5), mas foi significativamente maior quando da avaliação aos 109 dias (Fig. 5B). O resultado indica que, na primeira fase de avaliação, as populações autóctones da água marinha utilizada foram capazes de utilizar algumas das frações dos hidrocarbonetos de petróleo (possivelmente os de menor peso molecular), após esse período, a atividade de mineralização dos hidrocarbonetos residuais por essas populações autóctones foi reduzida (Fig. 5). Por outro lado, no tratamento contendo o consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas, a atividade de decomposição se manteve elevada durante todo o período experimental (tratamento 6, Fig. 5A e B), possivelmente como

resultado da capacidade dos isolados componentes do consórcio em degradar hidrocarbonetos de diferentes classes e tamanhos de cadeia.

A adição de biocarvão à emulsão fertilizada resultou em pequena redução da atividade respiratória no microcosmo contendo petróleo (tratamentos 5 e 7, Fig. 5), embora os valores absolutos não tenham sido significativamente diferentes. No entanto, aos 63 dias, o biocarvão fez com que a atividade respiratória fosse significativamente menor do que a obtida no tratamento sem biocarvão e que continha o consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas (tratamentos 6 e 7, Fig. 5A), ao passo que o mesmo tratamento sem biocarvão (tratamento 5) não diferiu desse último.

Considerando-se que, na ausência do biocarvão, as populações autóctones da água demonstraram ser capazes de degradar parte das moléculas de hidrocarbonetos de petróleo na primeira fase de avaliação (até 63 dias), mas não em sua presença, pode-se concluir que o biocarvão teve efeito negativo sobre a biodegradação dos hidrocarbonetos. Esse efeito é mais evidente quando se comparam as emissões de CO₂ dos tratamentos 6 e 8. Na primeira fase (até 63 dias), a adição do biocarvão à emulsão resultou em uma pequena redução da emissão de CO₂ pelo microcosmo contendo o consórcio (comparar tratamentos 6 e 8, Fig. 5A). Já ao final da incubação (109 dias), a comparação desses dois tratamentos mostra que o biocarvão teve um efeito negativo significativo sobre a biodegradação (Fig. 5B). Esse resultado não era o esperado, considerando que esse componente foi adicionado à formulação das emulsões com a expectativa de que, ao adsorver as moléculas de hidrocarbonetos e, ainda, funcionar como superfície para o crescimento bacteriano, pudesse facilitar o acesso dessas populações aos substratos hidrofóbicos, como demonstrado por Chang et al. (2017). Entretanto, naquele trabalho, os autores utilizaram BTEX (hidrocarbonetos aromáticos de cadeia curta, com baixo peso molecular e solubilidade relativamente elevada em água). Sendo assim, esses substratos estavam presentes na água, como moléculas dissolvidas, em baixas concentrações. Nessas circunstâncias, sua adsorção pelas partículas de biocarvão de fato parece favorecer a biodegradação, pelo efeito de concentração dessas moléculas na superfície onde as populações bacterianas se estabeleceram. Em nosso trabalho, foi estudada a biodegradação de hidrocarbonetos presentes em petróleo tratado termicamente e, como já destacado, de maior peso molecular e maior hidrofobicidade (SCHANTZ; MARTIRE, 1987).

Além disso, a temperatura relativamente baixa utilizada no processo de pirólise do biocarvão, nesse trabalho, tende a favorecer a obtenção de um material mais hidrofóbico (GRAY et al., 2014). Conseqüentemente, é possível concluir que as interações hidrofóbicas entre as moléculas de hidrocarbonetos e o biocarvão utilizados em nosso estudo eram muito mais intensas do que as que ocorreram no trabalho conduzido por Chang et al. (2017). Concluimos assim que essa forte interação ocorrida no presente trabalho resultou em um efeito inverso ao esperado, diminuindo a biodisponibilidade das moléculas de hidrocarbonetos e, assim, a sua biodegradação. A maior resistência à biodegradação dos hidrocarbonetos de cadeia pesada em relação aos de cadeia leve já foi relatada em estudos utilizando biocarvão (BEESLEY; MORENO-JIMÉNEZ; GOMEZ-EYLES, 2010; KONG et al., 2018; KUŚMIERZ et al., 2016), o que possivelmente explica o efeito negativo da sua adição aos microcosmos.

A adição da linhagem de *B. subtilis* RI4914 IsrfA à composição da emulsão, juntamente com o biocarvão (tratamento 9) não alterou a atividade respiratória, comparativamente ao tratamento apenas com biocarvão (tratamento 7, Fig. 5). Testes feitos posteriormente (item 3.7 dos Materiais e Métodos) indicaram que *B. subtilis* RI4914 IsrfA não possui a capacidade de crescer no meio da emulsão, possivelmente pela quantidade de sal presente naturalmente na água do mar. Em decorrência dessa incapacidade de crescimento, não houve a esperada produção de surfactina, a qual poderia estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nos microcosmos.

Nos tratamentos contendo emulsão acrescida de biocarvão, consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas e a linhagem *B. subtilis* RI4914 IsrfA geneticamente modificada produtora de surfactina, as diferentes concentrações de nutrientes minerais na fase aquosa interna (0,5X, 1X e 2X, tratamentos 10 a 12) não resultaram em diferenças significativas na emissão de CO₂ (Fig. 5). Apesar de se ter constatado a necessidade de um aporte de nitrogênio e fósforo a águas marinhas litorâneas para se estimular a biodegradação de compostos orgânicos, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que uma menor concentração desses nutrientes (0,5X) na fase aquosa interna, comparativamente à da formulação original proposta por Rodrigues et al. (2020), seria suficiente para sustentar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo nesse ambiente. Entretanto, a avaliação do efeito da concentração de nutrientes foi aplicada somente à formulação contendo biocarvão, o

qual, como destacado acima, limitou a atividade de biodegradação dos substratos hidrofóbicos (e, conseqüentemente, a demanda das populações microbianas por esses nutrientes minerais essenciais). Assim, não se pode excluir a possibilidade de que, numa situação em que a biodegradação não seja limitada pelo “aprisionamento” dos substratos a uma matriz hidrofóbica, uma maior disponibilidade de nutrientes minerais não seja favorável, especialmente se o ambiente alvo do estudo for o de águas oceânicas mais distantes do litoral e, portanto, ainda menos férteis (MADIGAN et al., 2016). Essa possibilidade deverá ser avaliada em estudos futuros, empregando-se especificamente as condições adotadas no tratamento 6 (ver figuras 4 e 5).

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados experimentais obtidos neste trabalho, conclui-se que as emulsões duplas fertilizadas são uma alternativa eficaz de biorremediação em ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Alterações na composição original da emulsão sugerida por Rodrigues et al. (2020), seja pelo aumento ou redução da concentração de nutrientes, seja pela incorporação de um material adsorvente (biocarvão), não resultaram em maior biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo. Ainda, a linhagem de *B. subtilis* RI4914 IsrA geneticamente modificada para maior produção do biossurfactante surfactina, não se mostrou efetiva para estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, pelo fato decorrente de sua limitação de crescimento em água marinha. Assim, a emulsão dupla fertilizada proposta por aqueles autores mostrou ser a mais eficaz em promover a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em águas marinhas litorâneas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. F. *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA: uma nova linhagem geneticamente melhorada para produção de surfactina. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- BAHTZ, J. et al. Quantification of Spontaneous W/O Emulsification and its Impact on the Swelling Kinetics of Multiple W/O/W Emulsions. **Langmuir**, v. 32, n. 23, p. 5787–5795, 14 jun. 2016.
- BAO, M. et al. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 6, p. 1177–1185, 1 jun. 2012.
- BARKER, A. V.; BRYSON, G. M. Bioremediation of Heavy Metals and Organic Toxicants by Composting. **The Scientific World JOURNAL**, v. 2, p. 407–420, 2002.
- BEESELEY, L.; MORENO-JIMÉNEZ, E.; GOMEZ-EYLES, J. L. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. **Environmental Pollution**, Advances of air pollution science: from forest decline to multiple-stress effects on forest ecosystem services. v. 158, n. 6, p. 2282–2287, 1 jun. 2010.
- BIBETTE, J.; CALDERON, F. L.; POULIN, P. Emulsions: basic principles. **Reports on Progress in Physics**, v. 62, n. 6, p. 969–1033, jan. 1999.
- BRAGG, J. R. et al. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. **Nature**, v. 368, n. 6470, p. 413–418, mar. 1994.
- CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J.-M. Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 111–126, 1 abr. 2003.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 97–116, 2010.
- CARMO, E. H. et al. Technological disasters and public health emergencies: the case of oil spill on the Brazilian coast. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, 2020.
- CAROLIN C, F.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 124827, 5 abr. 2021.
- CHANDRA, S. et al. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 417–431, jun. 2013.

CHANG, S.-H. et al. Fabrication of novel rhamnolipid-oxygen-releasing beads for bioremediation of groundwater containing high concentrations of BTEX. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 58–63, 1 jan. 2017.

CHEN, J. et al. Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 20–32, 1 ago. 2019.

CHOUDHARY, U.; SABIKHI, L. Effect of Selected Stabilizers and Processing Aids on the Stability of a Double Emulsion Encapsulating Bitter Gourd Extract: **Food Science and Engineering**, 29 jan. 2021.

FRANÇA, F. C. F. DE et al. New alkyl polyglycosides surfactants based on amylose extracted from english potato (*Solanum tuberosum* L.). **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 275–283, abr. 2017.

FRY, D. M.; LOWENSTINE, L. J. Pathology of Common Murres and Cassin's Auklets exposed to oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 725–737, 1 nov. 1985.

GERTLER, C. et al. Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, n. 3, p. 520–536, 2012.

GRAY, M. et al. Water uptake in biochars: The roles of porosity and hydrophobicity. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 196–205, 1 fev. 2014.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by "HLB". **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, n. 5, p. 311-26, 1949.

GUBIANI, P. I.; REINERT, D. J.; REICHERT, J. M. Método alternativo para a determinação da densidade de partículas do solo: exatidão, precisão e tempo de processamento. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 664–668, abr. 2006.

HALECKÝ, M.; KOZLIAK, E. Modern Bioremediation Approaches: Use of Biosurfactants, Emulsifiers, Enzymes, Biopesticides, GMOs. In: FILIP, J. et al. (Eds.). **Advanced Nano-Bio Technologies for Water and Soil Treatment**. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 495–526.

JACQUES, P. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (Ed.). **Biosurfactants: From Genes to Applications**. Microbiology Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. p. 57–91.

KANDANELLI, R. et al. Cost effective and practically viable oil spillage mitigation: Comprehensive study with biochar. **Marine Pollution Bulletin**, v. 128, p. 32–40, 1 mar. 2018.

KOK KEE, W. et al. Self-immobilised bacterial consortium culture as ready-to-use seed for crude oil bioremediation under various saline conditions and seawater.

International Journal of Environmental Science and Technology, v. 12, n. 7, p. 2253–2262, 1 jul. 2015.

KONG, L. et al. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 276–284, 5 fev. 2018.

KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Surfactants Used in Food Industry: A Review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 1363–1383, 30 set. 2009.

KUPPUSAMY, S. et al. Impact of Total Petroleum Hydrocarbons on Human Health. In: KUPPUSAMY, S. et al. (Eds.). **Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 139–165.

KUŚMIERZ, M. et al. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biochar-amended soil. **Chemosphere**, v. 146, p. 272–279, 1 mar. 2016.

LAI, C.-C. et al. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 609–614, 15 ago. 2009.

ŁAWNICZAK, Ł. et al. Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 856, jan. 2020.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock - 14^a Edição**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, p. 110961, 1 abr. 2020.

MCKEW, B. A. et al. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1562–1571, 2007.

MESSINGER, H. et al. Investigations on the effects of alkyl polyglucosides on development and fertility. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 8, p. 1375–1382, 1 ago. 2007.

MORITA, A. et al. Acute health problems among the people engaged in the cleanup of the Nakhodka oil spill. **Environmental Research**, v. 81, n. 3, p. 185–194, out. 1999.

MUSCHIOLIK, G.; DICKINSON, E. Double Emulsions Relevant to Food Systems: Preparation, Stability, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 532–555, 2017.

NAKANO, M. M. et al. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1770–1778, mar. 1991.

NOYCE, G. L. et al. The microbiomes and metagenomes of forest biochars. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 23 maio 2016.

ONWURAH, I. et al. Crude Oils Spills in the Environment, Effects and Some Innovative Clean-Up Biotechnologies. **International Journal of Environmental Research (ISSN: 1735-6865)**, v. 1, n. 4, 1 set. 2007.

ORANTAS, M. DE C. **Avaliação em microcosmo da degradação de borra oleosa no solo**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 155–162, jan. 2015.

PÉREZ SILVA, R. et al. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 strain. **Tecnología Química**, v. XXVI, p. 70-77, 4 jun. 2006.

PREMLAL RANJITH, H. M.; WIJEWARDENE, U. Lipid emulsifiers and surfactants in dairy and bakery products. In: GUNSTONE, F. D. (Ed.). **Modifying Lipids for Use in Food**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2006. p. 393–428.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 360–370, 3 jul. 2008.

RODRIGUES, E. M.; KALKS, K. H. M.; TÓTOLA, M. R. Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 156, p. 15–22, 1 jun. 2015.

RODRIGUES, E. M. et al. Strategy to improve crude oil biodegradation in oligotrophic aquatic environments: W/O/W fertilized emulsions and hydrocarbonoclastic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 20 fev. 2020.

RODRIGUES, E. M. et al. Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115579, 1 dez. 2020.

SCHANTZ, M. M.; MARTIRE, D. E. Determination of hydrocarbon-water partition coefficients from chromatographic data and based on solution thermodynamics and theory. **Journal of Chromatography A**, v. 391, p. 35–51, 1 jan. 1987.

SHAKOOR, M. B. et al. A review of biochar-based sorbents for separation of heavy metals from water. **International Journal of Phytoremediation**, v. 22, n. 2, p. 111–126, 28 jan. 2020.

SHORT, J. W. Advances in Understanding the Fate and Effects of Oil from Accidental Spills in the United States Beginning with the Exxon Valdez. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 5–11, 1 jul. 2017.

SOUZA, C. A. V. DE; FREITAS, C. M. DE. Perfil dos acidentes de trabalho em refinaria de petróleo. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 576–583, out. 2002.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 88–94, 1 abr. 2014.

SU, J. et al. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water–oil–water emulsions. **Food Hydrocolloids**, 7th International Hydrocolloids Conference. v. 20, n. 2, p. 261–268, 1 mar. 2006.

TANG, J. et al. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 653–659, 1 dez. 2013.

THIES, J.; RILLIG, M. Characteristics of biochar: biological properties. **Biochar for Environmental Management: Science and Technology**, p. 85–105, 1 jan. 2009.
VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 1 jul. 2001.

WARR, L. N. et al. Bioremediating Oil Spills in Nutrient Poor Ocean Waters Using Fertilized Clay Mineral Flakes: Some Experimental Constraints. **Biotechnology Research International**, v. 2013, 2013.

WHANG, L.-M. et al. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation--effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 1045–1050, 30 maio 2009.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257–266, jun. 2007.

ZHANG, H. et al. A novel bioremediation strategy for petroleum hydrocarbon pollutants using salt tolerant *Corynebacterium variabile* HRJ4 and biochar. **Journal of Environmental Sciences**, v. 47, p. 7–13, 1 set. 2016.

ZHU, X. et al. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 98–115, 1 ago. 2017.